

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS-JA TEHNOLOOGIA TEADUSKOND  
MOLEKULAAR-JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
MIKROBIOLOOGIA JA VIROLOOGIA ÕPPETOOL

Liis Noodla

**Inimese papilloomiviiruse tüüp 18 E2 valgu  
aminohappeliste asendusmutantide iseloomustamine  
viiruse transkriptsiooni ja replikatsiooni funktsioonides**

Magistritöö

Juhendaja MSc Mart Ustav jr

TARTU 2015

# SISUKORD

<b>SISUKORD</b>	2
<b>KASUTATUD LÜHENDID</b>	4
<b>SISSEJUHATUS</b>	6
<b>1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE</b>	7
<b>1.1 Papilloomiviiruste üldisloomustus</b>	7
<b>1.2 Inimese papilloomiviiruse genoom</b>	8
1.2.1 Inimese papilloomiviiruse viirusvalkude funktsioonid	10
1.2.1.1 Regulaatorvalgud	10
1.2.1.2 Onkogeensed valgud	12
1.2.1.3 Kapsiidivalgud	13
<b>1.3 Inimese papilloomiviiruse elutsükel</b>	13
1.3.1 Mitmekihilise lameepiteeli ülesehitus	13
1.3.2 HPV infektsiooni algus	13
1.3.3 HPV esialgne amplifikatsioon	14
1.3.4 HPV stabiilne säilumine peremeesrakus	15
1.3.5 HPV vegetatiivne amplifikatsioon ja virionide pakkimine	16
1.3.6 Inimese papilloomiviiruse onkogenees	17
<b>1.4 Inimese papilloomiviiruse E2 valk</b>	18
1.4.1 E2 valgu struktuur	18
1.4.2 E2 valgu ja DNA interaktsioonid	18
1.4.3 E2 interaktsioonid teiste valkudega	19
1.4.4 E2 kui regulatoorne valk	20
1.4.5 E2 valgu roll replikatsioonis	20
1.4.6 E2 valk stabiilses replikatsioonis ja segregatsioonis	21
<b>2. MATERJALID JA METOODIKA</b>	22
<b>2.1 Materjalid</b>	22
2.1.1 Plasmiidid	22
2.1.2 Ekspressioonivektorid	22
2.1.3 Oligonukleotiidid	23
2.1.4 Eukarüootsed rakuliinid	23
<b>2.2 Metoodika</b>	23
2.2.1 Klonerimine	23
2.2.2 HPV-18 <i>minicircle</i> tootmine	24
2.2.3 Eukarüootsete rakkude transformatsioon elektroporatsiooni meetodil	24

2.2.4	Totaalse DNA eraldamine .....	25
2.2.5	Replikatsioonianalüüs <i>Southern blot</i> meetodil .....	25
2.2.6	<i>Western blot</i> analüüsimetod .....	26
2.2.7	Transkriptsiooni aktivatsiooni uurimise katse .....	27
<b>3.</b>	<b>TULEMUSED</b> .....	<b>28</b>
3.1.	Töö eesmärgid .....	28
3.2.	HPV-18 mutatsioonide valik ja konstrueerimine .....	29
3.2.1.	HPV-18alaniini-asendus mutantide kloneerimine .....	33
3.3.	Mutantsete valkude ekspressioon .....	34
3.4.	Mutantsete valkude transientne replikatsioon .....	34
3.5.	E2 valgu tiitrimine transkriptsioonianalüüsi jaoks .....	36
3.6.	E2 valgu mutandid transaktivatsioonis .....	37
3.7.	HPV-18 E2 mutantsete <i>minicircle</i> ' te replikatsioon .....	39
	ARUTELU .....	41
	KOKKUVÕTE .....	45
	SUMMARY .....	46
	KASUTATUD KIRJANDUS .....	47
	LISAD .....	58
	Lisa 1 - Plasmiidid .....	58
	Lisa 2 - Ekspressioonivektorid .....	61

## KASUTATUD LÜHENDID

E2-BS	<i>E2 binding site</i> , seondumiskoht
bp	<i>Base pair</i> , aluspaar
BPV	<i>Bovine papillomavirus</i> , vesie papilloomiviirus
Brd4	<i>Bromodomain-containing protein 4</i> , bromodomeeni sisaldav valk 4
ChR1	<i>Chromate transport protein 1</i> , kromatiini transpordivalk 1
CIN	<i>Cervical intraepithelial neoplasia</i> , emakakaela intraepiteliaalne neoplaasia
CMV	<i>Cytomegalovirus</i> , tsütomegaloviirus
DBD	<i>DNA binding domain</i> , DNA-d seondav domeen
DDR	<i>DNA damage response</i> , DNA kahjustuse vastus
DTT	<i>Dithiothreitol</i> , ditiotreitool
E	<i>Early</i> , varajane
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> , etüleendiamiintetraäädikhape
EGF	<i>Epidermal growth factor</i> , epidermaalne kasvufaktor
HPV	<i>Human papillomavirus</i> , inimese papilloomiviirus
H-SIL	<i>High-grade squamous intraepithelial lesion</i> , kõrge astme intraepiteliaalne kahjustus
kDA	Kilodalton
L	<i>Late</i> , hiline
LB	Luria-Bertani sööde
LCR	<i>Long control region</i> , pikk kontrollpiirkond
L-SIL	<i>Low-grade squamous intraepithelial lesion</i> , madala astme intraepiteliaalne kahjustus
mc	<i>Minicircle</i> , pisirõngas
MCS	<i>Multiple cloning site</i> , multikloneerimissait
MKlp2	<i>Mitotic kinesin-like protein 2</i> , mitootiline kinesiinilaadne valk 2
MME	<i>Minichromosome maintenance element</i> , minikromosoomi säilitamise element
MO	<i>Minimal origin</i> , minimaalne replikatsiooni alguspunkt
OBD	<i>Origin binding domain</i> , originile seonduv domeen
ORF	<i>Open reading frame</i> , avatud lugemisraam
p/CAF	<i>p300/CBP-associated factor</i> , p300/CBP-assotsieerunud faktor
p300/CBP	<i>p300/CREB-binding protein</i> , p300/CREB-seondav valk
pA	<i>Polyadenylation site</i> , polüadenülatsioonisait
pAe	<i>Early polyadenylation site</i> , varajane polüadenülatsioonisait

pAI	<i>Late polyadenylation site</i> , hiline polüadenülatsioonisait
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , fosfatpuhvriga soolalahus
pRB	<i>Retinoblastoma supressorprotein</i> , retinoblastoomi valk
PV	<i>Papillomavirus</i> , papilloomviirus
rpm	<i>Rounds per minute</i> , pöörded minutis
SCC	<i>Squamous cell carcinoma</i> , lamedarakuline kartsinoom
SDS	<i>Sodium dodecylsulfate</i> , naatriumdodetsüülsulfaat
Sp1	<i>Specificity protein 1</i> , spetsiifilisuse valk 1 (transkriptsioonifaktor)
SSC	<i>Saline-sodium citrate</i> , naatriumkloriidi ja naatriumtsitraadi lahus
TAD	<i>Transactivation domain</i> , transaktivatsioonidomeen
TAE	Tris-atsetaat-EDTA puhver
TBP	<i>TATA-binding protein</i>
TE	Tris-EDTA puhver
TFIIB	<i>Transcription factor IIB</i> , transkriptsioonifaktor IIB
Tris	Trishüdroksümetüülaminometaan
URR	<i>Upstream regulatory region</i> , ülesvoolu regulatoorne ala
VLP	<i>Virus-like particle</i> , viiruslaadne partikel
wt	<i>Wilt type</i> , metsiktüüp

### **Aminohapped**

Q	Glutamiin, Gln
D	Asparagiinhape, Asp
E	Glutamiinhape, Glu
R	Arginiin, Arg
K	Lüsiin, Lys
I	Isoleutsiin, Ile
N	Asparagiin, Asn
A	Alaniin, Ala

## SISSEJUHATUS

Papilloomviirused on väikese genoomiga DNA viirused, mis nakatavad jagunemisvõimelisi epiteelkoe basaalkihi rakke. Papilloomiviirused on seadnud oma elutsükli vastavusse epiteelkoe rakkude diferentseerumisega. Inimese papilloomiviirused (HPV) on olulised uurimisobjektid ning nad jaotatakse kõrge- ja madalariski papilloomiviirusteks oma võime järgi tekitada pahaloomulisi kasvaja. Kõrgeriski HPV-sid seostatakse kõige enam emakakaelavähiga, mis on ligi 95% juhtudest tekitatud HPV poolt.

Papilloomiviiruse üheks peamiseks regulaatorvalguks on E2, mis osaleb nii viiruse genoomi replikatsioonis, transkriptsioonis regulatsioonis, kui ka vahendab viiruse genoomi jaotumist tütarakkudesse segregatsioonis. E2 valk jaotatakse kolmeks osaks: N-terminaalne transaktivatsioonidomeen, C-terminaalne DNA-d seondav domeen ning neid ühendav paindlik *hinge* piirkond. N-terminaalne domeen osaleb kõigil kolmel eelnimetatud protsessil ning funktsioonide täitmiseks interakteerub see mitmete viiruseliste ja rakuliste valkudega. N-terminaalse domeeni järjestus on papilloomiviiruse erinevate tüüpide seas suhteliselt konserveerunud, kus kindlad konserveerunud aminohapped vastutavad domeeni interaktsioonide eest teiste valkudega. Just seetõttu peaks N-terminaalne domeen olema tundlik aminohapete mutatsioonidele, mis võiks häirida E2 valgu võimet viia läbi viiruse DNA replikatsiooni ja transkriptsiooni.

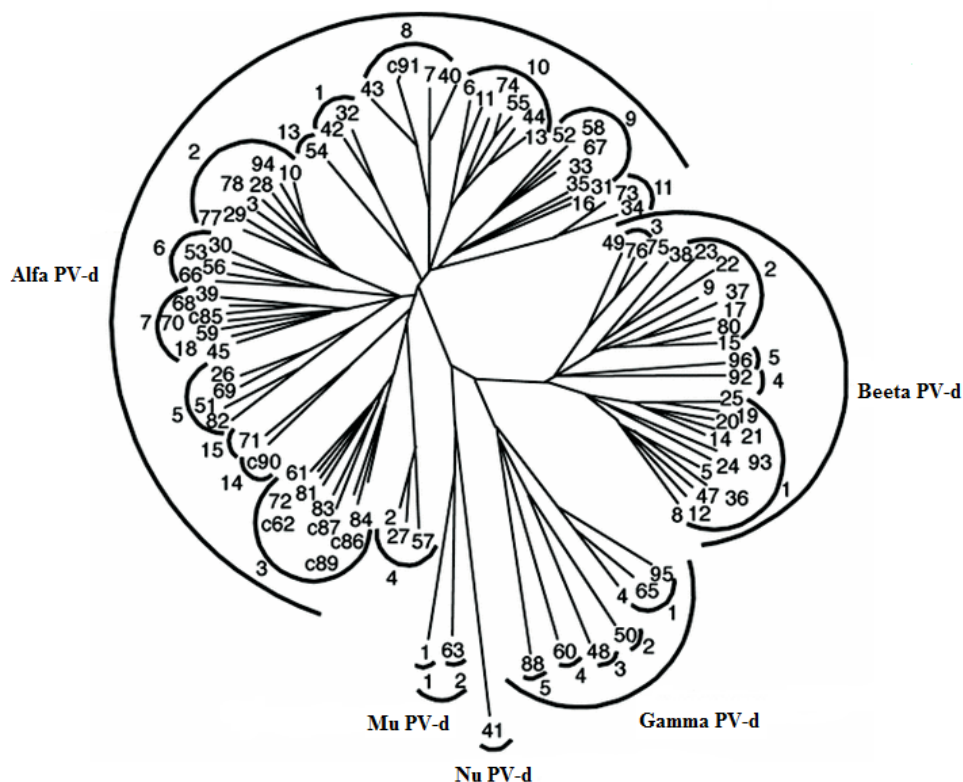
Töö teoreetilises osas antakse ülevaade inimese papilloomiviiruse (HPV) elutsüklist ning viiruse E2 valgu funktsioonidest replikatsioonis, transkriptsioonis ja segregatsioonis. Töö eksperimentaalses osas konstrueeriti 15 HPV-18 E2alaniini-asendusmutanti N-terminaalses osas ning uuriti nende võimet osaleda viiruse transientses DNA replikatsioonis ning nende võimet käituda transkriptsiooni regulaatoritena.

Töö valmis Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudi viirustel põhinevate tehnoloogiate ning HPV DNA replikatsiooni mehhanismidega tegelevas uurimisgrupis. Täna kõiki oma uurimisgrupi liikmeid ja eriti soovin tänada oma juhendajat, Mart Ustav jr tema asjaliku juhendamise ja toetuse eest.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1 Papilloomiviiruste üldiseloostus

Papilloomiviirused on äärmiselt mitmekesised liigiti ning nad on võimelised nakatama nii imetajaid, linde kui roomajaid. Papilloomiviirused kuuluvad sugukonda *Papillomaviridae* ning viiruse tüüpe ja alamtüüpe klassifitseeritakse viiruse L1 geeni järjestuse alusel, mis on kõige konserveerunud geen genoomis. Tänapäevaks on kirjeldatud ligi 190 papilloomiviirust, mis kuuluvad 29 erinevasse perekonda (de Villiers, Fauquet et al. 2004, Bernard, Burk et al. 2010).



**Joonis 1. Inimese papilloomiviiruse perekondade fülogeneetiline puu.** Joonisel on kujutatud inimese papilloomiviiruse alfa-, beeta-, gamma-, mu- ja nu perekonna viirusi (Doorbar 2006).

Kõige intensiivsemalt on uuritud papilloomiviirusi, mis nakatavad inimesi (inimese papilloomiviirused, HPV – *Human Papilloma Virus*). HPV-d jaotatakse viieks perekonnaks: alfa-, beeta-, gamma-, mu- ja nu-papilloomiviirused (joonis 1) (de Villiers, Fauquet et al. 2004). Kaks peamist HPV perekonda on alfa ja beeta. Beeta papilloomiviirusi seostatakse peamiselt nahainfektsioonidega, immuunpuudulikkusega inimestel võivad nad tekitada ka nahavähki (Harwood, Suretheran et al. 2004). Kõige suurem grupeering on alfa-papilloomiviirused, mis nakatavad peamiselt limaskesti kui ka nahka (näiteks HPV-2 ja -10) (Doorbar 2006). Limaskesti nakatavad üle 30 erineva HPV tüübi ning osad neist on seostatud kasvajatega.

Võime alusel indutseerida kasvajaid, jaotatakse HPV-sid kõrge ja madala riskiga tüüpideks. Madalriski tüübid (näiteks HPV-11) tekitavad tüükaid ja kondüloome, mis arenevad edasi vähiks väga harva. Kõrgeriski tüübid, nagu HPV-16 ja HPV-18, on võimelised tekitama aga pahaloolumulisi vähkkasvajaid (Doorbar 2005, Doorbar 2006). Kõige enam on kõrgeriski tüübid seotud emakakaelavähiga (Walboomers, Jacobs et al. 1999). Emakakaelavähk on sageduselt maailmas neljandal kohal ning arengumaades lausa sageduselt teine vähkkasvaja. Kuna globaalselt on emakakaelavähil kõrge suremusaste (52%) ning igal aastal lisandub ligi 450 000 uut juhtu (WHO 2015), siis on HPV-de alased uurimissuunad suure kliinilise tähtsusega ning seega on oluline mõista funktsioone ja mehhanisme.

Alates HPV infektsiooni ja emakakaelavähi vahelise seose avastamisest on olnud aktuaalne HPV vastaste vaktsiinide leidmine. 1991 arendati viiruslaadsete partiklite (VLP) tehnoloogia, mis oli oluline samm vaktsiinide arenduses (Zhou, Sun et al. 1991). Praegusel hetkel on globaalsel turul kaks vaktsiini: neljavalentne HPV vaktsiin Gardasil® (Merck & Co. Inc) ja kahevalentne Cervarix™ (GlaxoSmithKline plc.). Gardasil® sisaldab HPV tüüp 6, 11, 16 ja 18 L1 valgu antigeene ning Cervarix™ HPV-16 ja 18 L1 valgu antigeene (Schiller, Castellsague et al. 2008). Mõlemad vaktsiinid on saavutanud suurt edu emakakaelavähi ennetamises ja vähemalt 40 riiki on kaasanud HPV vaksineerimise riiklikusse vaksineerimisprogrammi (Markowitz, Tsu et al. 2012). Siiski säilib konkreetne vajadus preparaatide järgi, mis aitaks juba nakatunud indiviide. Seetõttu säilib HPV-de uurimisvajadus, et paremini mõista viiruse toimemehhanismi ja leida uusi sihtmärke HPV ravimite väljatöötamiseks. Praeguseks on arendatud mitmeid terapeutilisi preparaate, mis baseeruvad nii vektoritel, peptiididel kui ka DNA-l ning mille efektiivsust hinnatakse käimasolevate kliiniliste uuringutega (McKee, Bergot et al. 2015).

## **1.2 Inimese papilloomiviiruse genoom**

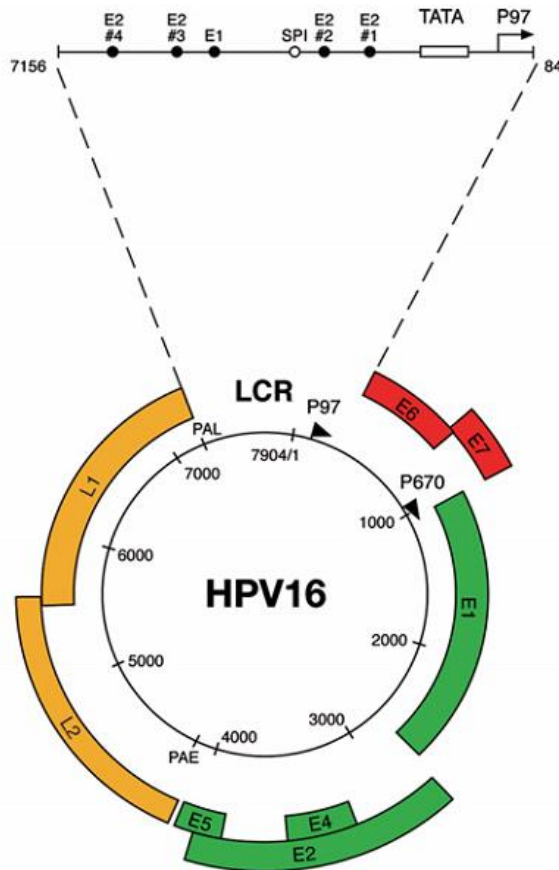
Papilloomiviirustel on kaheahelaline tsirkulaarne ja umbes 8 kb suurune DNA genoom (Joonis 2). Genoom on pakitud ikosaeedrilisse kapsiidi, millel puudub ümbris (*envelope*). Kapsiid koosneb 72 kapsomeerist. Virioni suuruseks on umbes 55 nm (Baker, Newcomb et al. 1991). Viiruse genoom on seotud rakuliste histoonidega ning moodustab kromatiini-laadse struktuuri (Doorbar 2005).

HPV genoomides on keskmiselt 8 lugemisraami (ORF – *open reading frame*) ning neid valke ekspresseeritakse polütsistronselt mRNA-lt, mida transkribeeritakse ühelt DNA ahelalt. Genoomi jaotatakse kolmeks põhiliseks regiooniks: varajaseks (E-*early*), hiliseks (L-*late*) ja



mitte-kodeerivaks regiooniks (LCR – *long control region* või URR – *upstream regulatory region*). Kolm regiooni on eraldatud kahe poliadenülatiooni (pA) saidi poolt: varajane pA (A<sub>E</sub>) ja hiline pA (A<sub>L</sub>). Papilloomiviiruste varajane regioon hõlmab üle 50% genoomist ning kodeerib kuut lugemisraami. Nendeks on E1, E2, E4, E5, E6, E7 ja E8,. Hiline regioon katab umbes 40% viiruse genoomist ning kodeerib L1 ja L2 ORF-e, mis transleeritakse kapsiidivalkudeks. URR regioon on umbes 850 bp suurune ning katab 10% genoomist. Sellel regulaatoralal pole valke kodeerivat funktsiooni, kuid seal asub replikatsiooni alguskoht, varajane ja hiline promooter ning mitmed transkriptsioonifaktorite seondumiskohad (Doorbar 2006, Zheng and Baker 2006, Conway and Meyers 2009).

HPV-18 genoomil on kaks põhilist promooterit, mis on aktiivsed viiruse elutsükli eri aegadel. HPV-18 P102 promooter vastutab pea kõikide varajaste geenide ekspressiooni eest ja P811 promooter vastutab hiliste geenide eest. HPV-18 P102 promooter on hästi kontrollitud URR regioonis asuvate *cis*-elementide poolt, mis interakteeruvad rakuliste transkriptsioonifaktoritega ja viraalsete transaktivaatorite/repressoritega ning reguleerivad transkriptsiooni. P102 on aktiivne mitte-diferentseerunud basaalarakkudest diferentseerunud keratinotsüütideni. Hiline promooter P811 on indutseeritav ainult diferentseerunud keratinotsüütides ning ta vahendab L1 ja L2 valkude translatsiooni (Zheng and Baker 2006, Conway and Meyers 2009). Lisaks on kindlaks tehtud mitmeid väiksemaid promootereid, mis mängivad olulist rolli viiruse elutsükli (Ozbun and Meyers 1998, Toots, Mannik et al. 2014).



**Joonis 2. HPV-16 genoomi organisatsioon.** HPV-16 genoom, millel on välja toodud nooltega varajane (P97) ja hiline (P670) promooter. Pildil on esitatud kuus varjast ORFi: E1, E2, E4 ja E5 (rohelisega) ning E6 ja E7 (punasega), mida ekspresseeritakse erinevates diferentseerumise staadiumis kas P97 või P670 promooterilt. Hilised ORF-id L1 ja L2 (kollasega) ekspresseeritakse hiliselt P670 promooterilt. Mittekodeeriv regioon URR (=LCR) on suurendatud ning esitab E2 ja E1 valgu seondumissaidid, p97 promooteri, TATA elemendi ja transkriptsioonifaktori SP1 seondumissaidi (Doorbar 2006).

## 1.2.1 Inimese papilloomiviiruse viirusvalkude funktsioonid

### 1.2.1.1 Regulaatorvalgud

**E1** valk on viiruse suurim valk (68-72 kDa) ning ka äärmiselt konserveerunud, mis viitab tema olulisele rollile viiruse genoomi replikatsioonis - ilma temata ei suuda viirus alata DNA replikatsiooni. E1 on DNA helikaas (Hughes and Romanos 1993) ning teda on vaja nii replikatsiooni initsiatsioonil kui ka elongatsioonil, et ta harutaks lahti DNA ahelad replikatsioonikahvli jaoks (Liu, Kuo et al. 1995). E1 valku ekspresseeritakse madalal tasemel, kuna tema ülekspressioon põhjustab DDR (*DNA damage response*) radade aktivatsiooni ning rakutsükli aresti S-faasis (Fradet-Turcotte, Bergeron-Labrecque et al. 2011, Sakakibara, Mitra et al. 2011, Reinson, Toots et al. 2013).

E1 valgul on N-terminaalne regioon, varieeruva suurusega *spacer* järjestus ning pikem C-terminaalne regioon. C-terminaalne pool vastutab valgu ATPaasse ja helikaasse aktiivuse eest. Seondudes viiruse originile paneb E1 valk end kokku heksameerseks helikaasiks, mis seondub DNA-le suure afiinsusega (Sedman and Stenlund 1998). E1 interakteerub viirusvalguga E2 ning DNA polümeraasi  $\alpha$ -primaasiga, mis aitab tuua rakulise replikatsioonikompleksi viiruse genoomi replikatsiooni alguskohta (Masterson, Stanley et al. 1998, Sun, Han et al. 1998). E1 valgu keskel asuv osa on origini-seondav domeen (*origin-binding domain* – OBD), mida on tarvis E1 dimerisatsiooniks ning viraalsele originile seondumiseks (Titolo, Brault et al. 2003). N-terminaalne regioon käitub regulaatorina ning mitmed seal asuvad elemendid on vajalikud efektiivseks replikatsiooniks (näiteks tuuma lokalisatsiooni signaal) (Morin, Fradet-Turcotte et al. 2011).

**E2** valk mängib võtmerolli viiruse geenide transkriptsiooni ja DNA replikatsiooni reguleerimisel. Ta on DNA-le dimeerina seonduv valk (Dostatni, Thierry et al. 1988). E2 valgul on C-terminaalne DNA-le seonduvast domään (*DNA-binding domain* – DBD) ning N-terminaalne trans-aktivatsiooni domään (TAD – *transactivation domain*). Nende vahel paikneb linker regioon (*hinge*) (Giri and Yaniv 1988).

E2 valk on oluline kogu viiruse elutsükli jooksul ning ta mõjutab seda seondudes kindlatele palindroomsetele järjestusele (ACCGNNNNcGGT), mida nimetatakse E2 seondumissaitideks (*E2-binding site* – E2-BS). Erinevatel papilloomiviiruse tüüpidel on erinev arv E2 seondumissaitide, näiteks veise papilloomiviirusel (*bovine papillomavirus* – BPV) 12 (Li, Knight et al. 1989) ja kõrgeriski HPV-del 4 (McBride, Romanczuk et al. 1991). E2 valk seondub saitidele erineva afiinsusega ning mõjutab sellega transkriptsiooni (Hegde 2002). E2 valk mängib olulist rolli ka replikatsioonil, kus ta vahendab E1 valgu seondumist replikatsiooni alguskohale (Mohr, Clark et al. 1990). Lisaks regulatoorsele rollile, aitab E2 valk vahendada viiruse genoomi segregatsiooni ja jaotumist tütarakkudesse (Skiadopoulos and McBride 1998, Van Tine, Dao et al. 2004).

**E4** on liitvalk ja teda ekspresseeritakse koos E1 valgu viie esimese aminohappega (E1<sup>E4</sup>). Tema lugemisraam asub varajaste geenide regioonis, kuid tema ekspressioonimuster asetab ta rohkem hiliste geenide hulka. Infektsiooni alguses on E1<sup>E4</sup> valgu süntees madalal tasemel (Hummel, Hudson et al. 1992). E4 valk on võimeline seonduma raku intermediaarsete filamentide võrgustikuga ning neid destabiliseerima, mille tagajärjel peremeesrakk kukub kokku ja virionid vabanevad keskkonda (Doorbar, Ely et al. 1991). E4 suudab indutseerida ka rakutsükli peatamist G<sub>2</sub> faasis ja viia peremeesrakku apoptoosi (Nakahara, Nishimura et al. 2002, Raj, Berguerand et al. 2004).

**E8** valk on liitvalk, mis sisaldab väikest konserveerunud E8 lugemisraami N-terminuses ja E2 valgu C-terminaalset domääni. Sellel valgul puudub E2 valgu N-terminaalne domeen, mis on vajalik transkriptsiooni ja DNA replikatsiooni regulatsiooniks. E8<sup>E2C</sup> valk on negatiivne genoomi replikatsiooni ja transkriptsiooni regulaator (Stubenrauch, Hummel et al. 2000). Tema väljalülitamine viib genoomi transientse replikatsiooni tõusuni (Kurg, Uusen et al. 2010).

### 1.2.1.2 Onkogeensed valgud

Papilloomiviirusel on kolm onkogeenset valku: E5, E6 ja E7. Rakutsükli kontrollivate valkude mõjutamisega kohandab HPV rakulise keskkonna enda genoomi replitseerimiseks sobivamaks.

**E5** valk on lühike, hüdrofoobne ja suhteliselt nõrga transformatsioonivõimega. E5 aitab võimendada E6 ja E7 valkude transformatsioonivõimet (Stoppler, Straight et al. 1996, DiMaio and Mattoon 2001). E5 valgu sihtmärgiks on rakulised membraanivalgud, mis reguleerivad rakkude kasvu. HPV E5 aktiveerib epidermaalse kasvufaktori (EGF) retseptorit ning hoiab teda pidevalt aktiivses olekus. See viib rakkude proliferatsioonini, kuna EGF retseptori pikendatud aktiivsusel on rakkudele mitogeenne mõju (Straight, Hinkle et al. 1993). E5 valk blokeerib apoptoosi, võimaldades säilitada viiruse jaoks sobivat keskkonda rakus (Zhang, Spandau et al. 2002). Näiteks inhibeerib E5 aukliiduste vahendatud rakkude suhtlemist (Oelze, Kartenbeck et al. 1995) ja vähendab antigeenide esitlemist MHC klass I ja II molekulidel (Zhang, Li et al. 2003).

**E6** valk on lühike valk, mille põhiliseks sihtmärgiks on tuumor-supressorvalk p53. p53 on transkriptsioonifaktor, mis kontrollib rakkude kasvu. Paljud kasvajaad inhibeerivad p53 tuumorsupressorit, et see ei saaks alata apoptoosi või kahjustuse parandamise radasid. HPV E6 valk seondub p53-ga ja vähendab selle lagundamist läbi ubikvitiin-sõltuva raja (Scheffner, Werness et al. 1990). Lisaks suurendab HPV E6 valgu ekspressioon telomeraasi aktiivsust ning pikendab rakkude eluiga (Klingelhutz, Foster et al. 1996).

**E7** on HPV peamine onkovalk, kuid ta on efektiivsem koos E6 valguga. Peamiseks rakuliseks valguks, millega E7 seondub, on retinoblastoomi tuumor-supressorvalk (p105-RB) (Munger, Werness et al. 1989). RB valkude üheks põhifunktsiooniks on reguleerida E2F transkriptsioonifaktorite aktiivsust. Viimaste rollideks on näiteks rakkude elutsükli reguleerimine, proliferatsiooni allasurumine ja diferentseerumise stimuleerimine (Dyson 1998). G1 faasis käitub pRB-E2F kompleks transkriptsioonilise repressorina ning kui pRB valk suunatakse lagundamisele, siis E2F võimaldab rakkudel siseneda S-faasi (Munger, Werness et

al. 1989). Nii kõrge- kui madalriski HPV-de E7 valgud seonduvad pRB-d, kuid kõrgeriski tüüpide seondumisaffiinsus on ligi 10 korda suurem (Munger, Scheffner et al. 1992).

### **1.2.1.3 Kapsiidi valgud**

**L1** on peamine kapsiidi valk, mis koos teise hilise valguga **L2** moodustavad viiruse kapsiidi. **L1** on võimeline end kokku panema viiruslaadseteks partikliteks (VLP – *virus like particle*), mis on sarnased tegelikule virionile (Kirnbauer, Booy et al. 1992). VLP-d on immuunogeenid ning neid on võimalik kasutada vaktsiinide arenduses (Rose, Reichman et al. 1994). Lisaks **L1** valgule on HPV-del ka väike kapsiidi valk **L2**, mis aitab pakkida DNA viiruse genoomi (Stauffer, Raj et al. 1998). Lisaks aitab **L2** papilloomiviirustel siseneda peremeesrakkudesse (Yang, Day et al. 2003).

## **1.3 Inimese papilloomiviiruse elutsükkel**

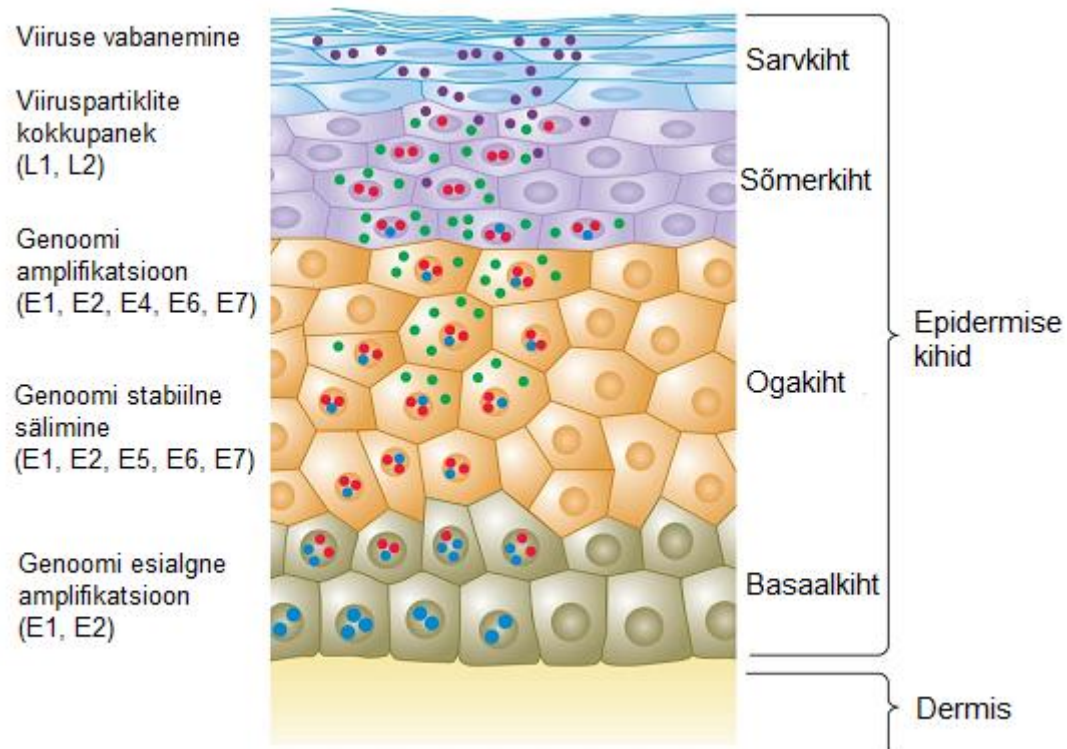
### **1.3.1 Mitmekihilise lameepiteeli ülesehitus**

Inimese nahk on ülesehituselt mitmekihiline lameepiteel, mis koosneb neljast erinevast kihist. Kõige alumiseks kihiks on basaalkiht, kus asuvad kõik epidermise jagunemisvõimelised rakud ning sealt algab diferentseerumine järgmisesse kihti. Järgneb ogakiht, kus jätkub rakkude diferentseerumine ning siis sõmerkiht. Kõige pealmisemaks kihiks on sarvkiht, kus keratinotsüüdid on lõplikult diferentseerunud. Seal toimuvad ulatuslikud muutused rakkudes: hävineb rakutuum ja mitmed organelid (mitokondrid ja Golgi kompleks) ning säilivad vaid epidermise riismed. Kõige pealmised keratinotsüüdid irduvad sarvkihist surnud rakkudena. Emakakaela kattev pealne kiht on limaskest, mis on sarvestumata mitmekihiline epiteel. Emakakaela epiteeli ülesehitus sarnaneb epidermise omaga (Arend *et al* 1994).

### **1.3.2 HPV infektsiooni algus**

HPV infektsiooniks on vaja, et viiruspartiklid suudaksid läbi nahakahjustuse tungida basaalkihti ning siseneda jagunevatesse basaalarakkudesse. Viiruse sisenemiseks on vajalikud raku pinnal asuvad retseptorid ning arvatakse, et kindlasti on vajalik hepariinsulfiidi olemasolu rakule kinnitumiseks (Shafti-Keramat, Handisurya et al. 2003). HPV partiklid viiakse rakku aeglaselt klatriiniga kaetud vesiikulite endotsütoosi kaudu. Järgnevalt lagunevad viiruspartiklid hilistes endosoomides ja lüsoosoomides ning DNA viiakse tuuma, kus see säilib ekstrakromosomaalse

episoomina (Day, Lowy et al. 2003). Edasi viib HPV enda DNA replikatsiooni ja säilimistsükli vastavusse keratinotsüütide diferentseerumisega (Joonis 3). Papilloomiviiruse elutsükli võib eristada kolme erinevat viiruse genoomi replikatsiooni faasi: lühiajaline e transientne esialgne amplifikatsioon, stabiilne säilimine ja lõpuks vegetatiivne amplifikatsioon. HPV replikatsioonitsükkel kestab vähemalt 3 nädalat, mis on aeg, mille jooksul keratinotsüüdid läbivad diferentseerumistsükli.

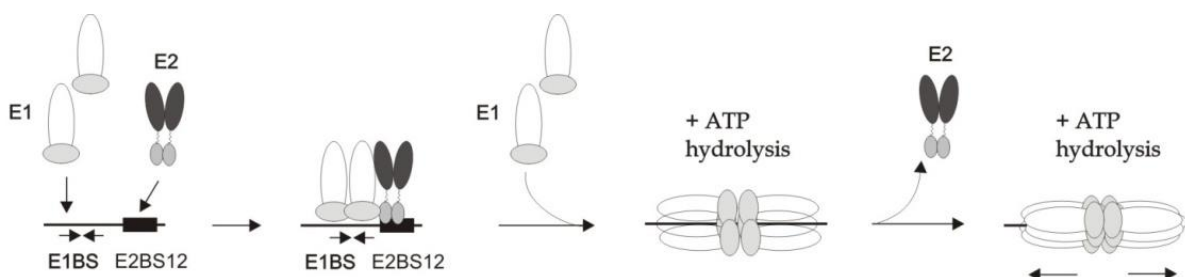


**Joonis 3. Papilloomiviiruse nakatumisjärgne elutsükkel.** Joonisel on kujutatud HPV elutsükli, mis on tihedalt seotud keratinotsüütide diferentseerumisega (Lazarczyk, Cassonnet et al. 2009).

### 1.3.3 HPV esialgne amplifikatsioon

Pärast HPV infektsiooni mikrohaavandite kaudu ja DNA sisenemist tuuma toimub varajaste valkude ekspressioon. Selleks aktiveeritakse varajane promooter ning hakatakse tootma E1 ja E2 valke, mis on mõlemad vajalikud replikatsiooni origini äratundmiseks ja edasiseks replikatsiooniks (Ustav and Stenlund 1991). Mitte-kodeerivas URR regioonis asuvad seondumissaidid nii E2 kui ka E1 valgule (Ustav, Ustav et al. 1991). Kuna E1 valk ei ole iseseisvalt oma äratundmisjärjestusele võimeline seonduma, on vajalik E1 valgu seondumine E2 valgu abil, et tuua E1 helikaas kohale viiruse replikatsiooni originile URR piirkonnas. Kui mõlemad valgud on originile seondunud, siis tuuakse kohale teine E1 valgu dimeer ja kompleksist vabaneb E2 (Sanders and Stenlund 1998). Nüüd korraldab E1 valk end

heksameerseks helikaasiks, mis sulatab DNA kaksikahela lahti (Joonis 4). E1 seondub veel omakorda rakuliste replikatsioonivalkudega (replikatsiooni valk A, DNA polümeraasi  $\alpha$  primaas) ning replikatsioon saab toimuda (Masterson, Stanley et al. 1998, Han, Loo et al. 1999). Alge replikatsiooni tulemusena tõuseb viiruse koopiaarv raku kohta nii kuni 200 koopiani.



**Joonis 4. HPV DNA replikatsiooni initsiatsioonikompleksi moodustumine replikatsiooni originil.**

E1 ja E2 valgud seonduvad kooperatiivselt replikatsiooni originile vastavatesse seondumissaitidesse ja moodustub kõrge spetsiifilisusega kompleks. Pärast kompleksi moodustumist tuuakse kohale teine E1 valgu dimeer ja E2 valk vabaneb kompleksist. E1 valgud korraldatakse heksameerseks helikaasiks, mis sulatab kaksikahela lahti initsiatsiooni piirkonnas (Kurg 2011).

HPV transientne replikatsioon on lühiajaline, kuna E2 valk käitub kui transkriptsiooniline regulaator. Amplifikatsiooni alguses, kui E2 valku on rakus vähesel hulgal, käitub ta kui aktivaator. E2 taseme tõustes, käitub E2 kui repressor ning väheneb replikatsiooniks vajalike E1 ja E2 valkude hulk (Doorbar 2006). Seega esmaseks amplifikatsiooniks on vaja ainult kahte viiruse valku ja esmast amplifikatsiooni saab kontrollida koekultuuris koos reporterplasmiidiga millel on viiruse replikatsiooni origin ning E1 ja E2 antakse ekspressioonivektoritelt.

#### 1.3.4 HPV stabiilne säilumine peremeesrakus

Esmasele amplifikatsioonile järgneb stabiilse säilimise faas, mille käigus säilitatav viiruse genoomi koopiaarv rakus on konstantne. Arvatakse, et seda saavutatakse läbi stabiilse replikatsiooni, kus viiruse genoom kahekordistub rakutsükli S-faasis ja genoomid segregeeruvad võrdselt kahe tütaraku vahel. Üheks stabiilse replikatsiooni mehhanismiks võiks olla viiruse DNA replitseerumine sarnaselt raku DNA-ga e üks kord S-faasis ja mis toetuks ainult rakulistele replikatsioonifaktoritele. Teiseks võimaluseks on, et HPV DNA replitseerub juhuslikult: mõned molekulid replitseeruvad mitu korda S-faasis, mõni üks kord ja

mõni aga üldse mitte (Hoffmann, Hirt et al. 2006). Siiski mõlematel neist juhtudest peaks HPV genoom säilitama oma algses amplifikatsioonis saavutatud kindla koopiaarvu.

Stabiilsel replikatsioonis on oluline, et HPV episoomid jaotuksid võrdselt tütarakkude vahel. Kui veise papilloomiviiruse (BPV-1 – *bovine papillomavirus type 1*) uuringutest on teada, et viiruse genoomi segregatsiooniks on vaja E2 seondumist tema seondumissaitidele URR regioonis (Piirsoo, Ustav et al. 1996), siis HPV-del pole see protsess veel väga hästi teada. On näidatud, et HPV E2 valgud lokaliseeruvad mitootilistele kääviniitidele mitte kromosoomidele nagu BPV-1 (Van Tine, Dao et al. 2004). BPV-1 on segregatsioonis oluline E2 valgude seondumine rakulise valguga Brd-4ga (You, Croyle et al. 2004). Ka HPV-d interakteeruvad rakulise Brd4-ga, kuid neil on erinev seondumisafiinsus, seega võib arvata, et HPV-del on ka teisi rakulisi interaktsioonipartnereid. Samuti pole näidatud, et HPV-de E2 valk kolokaliseeruks koos Brd4 valguga mitootilistel kromosoomidel (McPhillips, Oliveira et al. 2006, Poddar, Reed et al. 2009).

### **1.3.5 HPV vegetatiivne amplifikatsioon ja virionide pakkimine**

Viimaseks papilloomiviiruste DNA replikatsiooni faasiks elutsükli lõppetapil on vegetatiivne amplifikatsioon, mille käigus viiruse genoomi koopiaarv tõuseb mitme tuhandeni. Kui terves epiteelis ei ole basaalkihilt lahkunud rakud enam jagunemisvõimelised, siis HPV infektsiooni korral rakud jäävad mitootiliselt aktiivseks. Suurenenud proliferatsiooni põhjuseks on viiruse onkogeenide E6 ja E7 ekspressioonid, mis võimaldavad rakkudel minna S-faasi ja kaotada normaalne rakutsükli kontroll. See on vajalik, et viirusel oleks võimalik kasutada raku replikatsioonimehhanisme võimaldamaks hiliste geenide ekspressiooni (Stubenrauch and Laimins 1999). HPV-de geeniekspressioon on tihedalt seotud epiteeli diferentseerumisastmega. Kui HPV-ga nakatunud rakud jõuavad epiteelis suprabasaalsesse kihti, siis toimub lülitumine varajaselt promooterilt hilisele promooterile, mis asub E7 ORF-is (Spink and Laimins 2005).

Viimaseks infektsiooni etapiks on viiruse genoomide pakkimine infektsioonilistesse partiklitesse. Genoomi amplifikatsiooni käigus kuhjuvad hilised valgud L1 ja L2. Esmalt sünteesitakse ja viiakse tuuma L2 valgud. L1 valgud assambleeruvad kapsomeerideks tsütoplasmas ning seejärel tuumas moodustavad koos L2-ga kapsiidid (Florin, Sapp et al. 2002). Tuumas pakitakse kapsiididesse viiruse DNA ning virionid vabanevad keskkonda epiteeli pindmisest kihist. Surnud rakkudest vabanemist vahendab E1<sup>E4</sup> valk, mis interakteerub rakulise keratiini võrgustikuga ning põhjustab selle kokku kukkumist (Doorbar, Ely et al. 1991).



### 1.3.6 Inimese papilloomiviiruse onkogenees

Inimese papilloomiviiruse riskitüübid (HPV-16 ja HPV-18) on meditsiiniliselt tähtsad uurimisobjektid, kuna nende infektsioonid võivad areneda kasvajateks. HPV DNA-d võib leida pea 93% diagnoositud emakakaelavähkides (Walboomers, Jacobs et al. 1999). Siiski arenevad väga vähesed HPV infektsioonid edasi vähiks. Naistel, kellel HPV infektsiooni immuunsüsteemi poolt ei kõrvaldata, võib see edasi areneda esimese astme emakakaela intraepiteliaalseks neoplaasiaks (CIN 1 – *cervical intraepithelial neoplasia*) või progresseeruda edasi vastavalt CIN 2, CIN 3 astmeteks ja lõpuks lamedarakuliseks kartsinoomiks (SCC – *squamous cell carcinoma*). CIN 1 tähistab kergeid, CIN 2 mõõdukaid ning CIN 3 juba raskeid rakumuutusi. Histoloogiliselt vastab CIN 1 ka madala astme intraepiteliaalsele koekahjustusele (L-SIL – *low-grade squamous intraepithelial lesion*) ning CIN 2/3 kõrge astme kahjustustele (H-SIL – *high grade squamous intraepithelial lesion*) (Steenbergen, de Wilde et al. 2005).

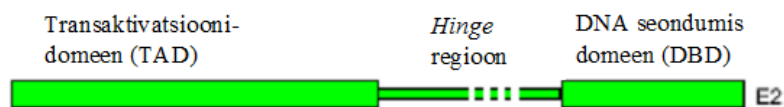
Viiruse tavapärases elutsüklis on E6 ja E7 onkovalkudel transformeeriv ja rakutsüklit reguleeriv roll. E6 seondub tuumorsupressor p53-ga ning suunab selle lagundamise, millega kaasnevalt ei lähe rakud apoptoosi (Scheffner, Werness et al. 1990). E7 valk interakteerub teise tuumorsupressorvalguga pRb ning sellega mõjutatakse pRb kontrolli G1/S üleminekule rakutsüklis (Dyson 1998). Mõlema valgu episomaalne ekspressioon on kindlalt reguleeritud ja on kõrge tasemega vaid suprabasaalsetes rakkudes. Need rakud ei ole mitootiliselt aktiivsed ja seega on vaja nende replikatsioonimehhanisme aktiveerida, et viirus saaks amplifitseeruda (Stoler, Rhodes et al. 1992). Üheks põhiliseks sündmuseks, mille tagajärjel kahjustused on võimelised edasi arenema kõrge tasemega neoplaasiateks, on muutused viiruse transformeerivate valkude ekspressioonis, mis viib rakkude suurenenud proliferatsioonini. Onkogeenide ekspressioon ka juba basaalsetes epiteelirakkudes inhibeerib diferentseerumist ning võib viia pahaloomulise fenotüübini (Munger, Baldwin et al. 2004). Suuremal osal emakakaela kasvajatel on viiruseline DNA integreerunud genoomi, mille korral kõrgeriski tüübid ei saa oma elutsüklit lõpuni viia. Integratsioonil rikutakse sageli E2 valgu lugemisraam, mis ei inhibeeri enam transkriptsiooni ning tõuseb E6 ja E7 valgu tase (Corden, Sant-Cassia et al. 1999, Munger, Baldwin et al. 2004). Koos nende valkude tõusuga suureneb aga ka genoomi ebastabiilsus, mis võib lõpuks viia halvaloomuliste muutusteni (White, Livanos et al. 1994).

## 1.4 Inimese papilloomiviiruse E2 valk

E2 valk on oluline regulatoorne valk, mida kodeerivad kõik papilloomiviiruse tüübid. E2 on multifunktsionaalne ning ta osaleb paljudes viiruse elutsükli etappides, kuid kõige rohkem on ta seotud viiruse genoomi transkriptsiooni ja replikatsiooniga.

### 1.4.1 E2 valgu struktuur

Täispikk E2 (45 kDa) valk koosneb konserveerunud N-terminaalsest transaktivatsiooni domeenist (TAD – *transactivation domain*), mis on ligi 200 aminohappe pikkune ning C-terminaalsest DNA-d seondavast domeenist (DBD – *DNA binding domain*), mis on ligi 100 aminohappe pikkune. Kahte domeeni ühendab paindlik linker järjestus (*hinge region*), mille pikkus on varieeruv (Giri and Yaniv 1988) (Joonis 5). Rakkudes, mis ei ole veel diferentseerunud, transkribeeritakse E2 mRNA-d varajaselt promooterilt. Koos rakkude diferentseerumisega aktiveeritakse hiline promooter, et saaks kodeerida vajaminevat E2 valku vegetatiivseks replikatsiooniks (Johansson and Schwartz 2013).

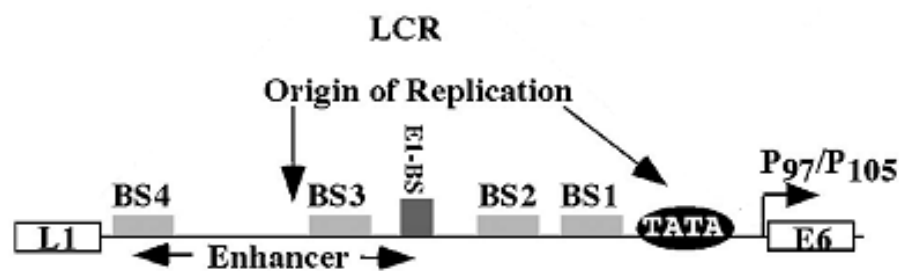


**Joonis 5. E2 valgu struktuur** (kasutatud McBride 2013). Kujutatud on täispika E2 valgu domeene: transaktivatsiooni domeen (TAD – *transactivation domain*), varieeruva järjestusega *hinge* regioon ja DNA seondumisdomeen (DBD – *DNA binding domain*).

### 1.4.2 E2 valgu ja DNA interaktsioonid

Kõik E2 valgud seonduvad dimeerina palindroomset järjestust ACCgNNNNcGGT (E2-BS - *E2-binding site*), mis asuvad URR regioonis (Joonis 6). DNA järjestusele seondumine toimub C-terminaalse DNA-d seondava domeeni kaudu. Keskne NNNN regioon on spacer regioon ning tema pikkus on kindlalt konserveerunud, kuid järjestus võib varieeruda. Väikeste tähtedena esitatud nukleotiidide versioonid ei ole tingimusteta vajalikud, kuid on soovitatavad spetsiifiliseks seondumiseks (Hawley-Nelson, Androphy et al. 1988). Erinevatel papilloomiviiruse tüüpidel on erinev arv seondumissaiti. Näiteks veise papilloomiviirusel (BPV-1) on kokku 17 seondumissaiti: 12 palindroomset järjestust ning lisaks veel 5 saiti, mis erinevad ühe nukleotiidi positsiooni poolest (Li, Knight et al. 1989). Kõrgeriski HPV

genoomides on neli E2-BS-i, mis asuvad varajasest promooterist ülespoole. Sõltuvalt sellest, milline afiinsus on E2 valgul seondumiskohale või kui kaugel asub seondumiskoht promooterist, on E2 ja E2-BS interaktsioonid võimelised kas represseerima või aktiveerima promooterit. E2 valk seondub kõige tugevamini promooterist kõige kaugemal asetsevale seondumissaidile (BS4) ning kõige nõrgemalt promooterile kõige lähemal asuvale saidile (BS1) (Romanczuk, Thierry et al. 1990). E2 seondub järjestusele suurema afiinsusega, kui NNNN *spacer* sisaldab rohkem A:T aluspaare (Bedrosian and Bastiav 1990). Samuti on eelistatud AA[A/T]N järjestus (nt AATT E2-BS-ile seondub E2 tugevamini (Hines, Meghoo et al. 1998).



**Joonis 6. Kõrgeriski HPV URR piirkonna ülesehitus.** Joonisel on kujutatud viiruse replikatsioonivalgu E1 seondumiskoht (E1BS) ning regulaatorvalgu E2 neli seondumiskohta (E2BS 1-4). Noolega on märgitud varajane (P97/P105) promooter ja TATA box (Hegde 2002).

### 1.4.3 E2 interaktsioonid teiste valkudega

E2 valgu N-terminaalse transaktivatsioonidomeeni kaudu interakteerub E2 nii viiruse helikaasiga E1 kui ka mitmete teiste rakuliste valkudega. Läbi interaktsioonide erinevate valkudega suudab E2 mõjutada nii viiruse genoomi replikatsiooni kui transkriptsiooni. E2 aktiveerib viiruse replikatsiooni seondudes kooperatiivselt E1 valguga, mis tunneb ära DNA replikatsiooni origini (Ustav and Stenlund 1991). E2 reguleerib ka viiruse transkriptsiooni, seondudes rakuliste transkriptsioonifaktoritega nagu TBP (*TATA-binding protein*) (Steger, Ham et al. 1995), TFIIB (transkriptsioonifaktor II B) (Benson, Lawande et al. 1997), Sp1 (promooterit seondav valk) (Li, Knight et al. 1991), AMF-1 (transkriptsiooniline koaktivaator) (Breiding, Sverdrup et al. 1997), p/CAF (transkriptsiooniline koaktivaator ja histooni deatsetülaas) (Lee, Hwang et al. 2002), p300/CBP (transkriptsiooniline koaktivaator ja histooni deatsetülaas) (Lee, Lee et al. 2000, Muller, Ritzkowsky et al. 2002) ja mitmed teised.

#### 1.4.4 E2 kui regulatoorne valk

E2 valk on üks peamisi papilloomiviiruste transkriptsioonilaseid regulaatoreid. E2 käitumine regulaatorina sõltub tema rakusisest kontsentratsioonist. Madalatel kontsentratsioonidel E2 aktiveerib ning kõrgetel kontsentratsioonidel surub transkriptsiooni alla (Steger and Corbach 1997). E2 roll on sõltuv ka papilloomiviiruse tüübist, kui BPV-1 aktiveerib E2 valk varajasi geene, siis HPV-del on E2 varajaste geenide repressor (Spalholz, Yang et al. 1985, Soeda, Ferran et al. 2006).

E2 vahendab oma regulatoorset rolli seondudes E2 seondumissaitidele ja selle kaudu suudavad nad kas transkriptsiooni aktiveerida või alla suruda. Kui E2 valk seondub kahele seondumissaidile (E2BS-2 ja E2BS-1), mis asuvad transkriptsiooni alguskohale kõige lähemal, siis see blokeerib rakuliste transkriptsioonifaktorite seondumise külgnevatele järjestusele ning seega surub transkriptsiooni initsiatsiooni maha. Näiteks kui E2 seondub E2BS-1-le, mis asub TATA elemendi kõrval, siis ei pruugi transkriptsioonifaktor TBP (*TATA-binding protein*) tunda TATA elementi ära. E2 valk seondub kõige suurema afiinsusega BS4-le ning vähendatud afiinsusega seondumissaitidele BS-1 ja BS-2. Madalal E2 valgu ekspressioonitasemel seondub E2 varajasest promooterist kõige kaugemal asuvale saidile (E2BS-4) ja aktiveerib viiruse transkriptsiooni. Sellega kindlustatakse, et onkogeenseid valke E6 ja E7 ekspresseeritaks kindlal tasemel, et säilitada viiruse replikatsiooniks vajalik keskkond. Kui aga E2 valgu tase tõuseb, siis E2 hakkab seonduma ka väiksema afiinsusega promooterist proksimaalsetele saitidele ning hakatakse transkriptsiooni maha suruma. Samas saab alata DNA replikatsioon (Steger and Corbach 1997, Stubenrauch, Lim et al. 1998, Hegde 2002).

E2 valgu üheks enimkirjeldatud rakuliseks partneriks on bromodomeeni valk Brd4 ning nende interaktsioon on vajalik nii E2 repressiooni kui transaktivatsiooni funktsioonideks (Schweiger, Ottinger et al. 2007). Läbi Brd4 ja transaktivatsiooni domeeni kaudu seondub E2 transkriptsiooniliselt aktiivse rakulise kromatiiniga, millega hoitakse ära viiruse genoomide vaigistamine transkriptsiooniliselt aktiivsetes tuuma piirkondades (Jang, Kwon et al. 2009). Samuti võib Brd4 käituda kui transkriptsiooni korepressor, kuna ta on võimeline inhibeerima läbi E2 valgu onkovalkude E6 ja E7 ekspressiooni (Wu, Lee et al. 2006).

#### 1.4.5 E2 valgu roll replikatsioonis

Viiruse genoomi replikatsiooniks on vaja E1 ja E2 valkude ekspressiooni, kõik teised replikatsiooniks vajalikud valgud ja ensüümid tulevad peremeesrakult. HPV DNA

replikatsioon algab replikatsiooni originilt, mis koosneb ühest E1 ja kolmest E2 seondumissaidist (joonis 6) (Ustav and Stenlund 1991, Ustav, Ustav et al. 1991).

E1 on peamine replikatsioonivalk, kuid E2 abistab ja võimendab E1 valgu funktsioone. E1 tunneb ära replikatsiooni origini ning harutab lahti DNA kaksikheeliksi. Siiski on E1 valgul madal järjestusspetsiifilisus ja võib alata replikatsiooni ka teistelt DNA järjestustelt (Bonne-Andrea, Santucci et al. 1995). E2 valgu abil tuntakse õiget järjestust paremini ära. Samuti võimendab E2 valk E1 seondumist DNA-le läbi oma DNA-d seondava domeeni. Pärast E1-E2 kompleksi moodustumist asendavad lisa E1 molekulid E2 valgu (Sedman and Stenlund 1995). E1 korraldab ennast ümber heksameerseks kompleksiks, mille helikaasne aktiivsus sulatab lahti DNA ahela ja viiruse DNA replikatsioon võib alata (Sedman and Stenlund 1998).

#### **1.4.6 E2 valk stabiilses replikatsioonis ja segregatsioonis**

Inimese naharakkudes säilitatakse HPV genoomi stabiilse koopianumbrina pika aja jooksul ja selleks on vajalik viiruse DNA jagunemine tütarakkude vahel. Papilloomiviirustel võtab segregatsioonist aktiivselt osa E2 valk, mis vahendab viiruse genoomide jaotumist läbi kromosoomidele kinnitumise (Bastien and McBride 2000). BPV-1 vajab kindlat URR regiooni järjestust MME-d (*minicrhromosome maintenance element*), mis koosneb vähemalt kuuest E2 seondumissaidist ja minimaalsest replikatsiooni originist MO (*minimal origin*). MME koos E2 seondumissaitidega (vähemalt 6) ja E2 valgu ekspressiooniga tagab segregatsiooni tütarakkude vahel (Piirsoo, Ustav et al. 1996, Skiadopoulos and McBride 1998). BPV-1 seondub E2 valgu aktivatsioonidomeeni kromosoomidele ja DNA-d seondav domeen kinnitab viiruse genoomid, et nad jaotuksid mitoosi ajal õigesti. E2 rakuliseks retseptoriks mitootilistel kromosoomidel on bromodomeeni valk Brd4 (You, Croyle et al. 2004).

HPV genoomi ülesehitus erineb aga suuresti BPV omast, kuna HPV-del asub URR piirkonnas kokku ainult 4 E2 seondumissaiti, millest kolme on vaja replikatsiooniks (Stubenrauch, Lim et al. 1998). Samuti on näidatud, et kõrgeriski HPV-de E2 valgud ei interakteeru Brd4-ga peremeesraku kromosoomidel ja seega kasutavad segregeerumiseks teistsugust mehhanismi (Oliveira, Colf et al. 2006). HPV E2 valkudele on pakutud välja erinevaid interaktsioon partnereid. Üheks võimalikuks retseptoriks on DNA helikaas ChR1, mis kolokaliseerub koos E1-ga varajases mitoosis ja aitab kinnituda kromosoomidele (Parish, Bean et al. 2006). Siiski on näidatud, et HPV-del seondub E2 valk mitoosi käigus pigem mitoosikäävidele kui kromosoomidele (Van Tine, Dao et al. 2004). Mitoosikäävidel paikneva partnerina on pakutud mitootilist kinesiinilaadset valku MKlp2 (Yu, Peng et al. 2007).

## 2. MATERJALID JA METOODIKA

### 2.1 Materjalid

#### 2.1.1 Plasmiidid

- **pMC.BESPX-HPV18** – ligikaudu 12 kbp suurune HPV-18 *minicircle* tegemiseks vajalik plasmiid, mis koosneb pMC.BESPX vektorist ja HPV-18 genoomist (kloneerituna attP ja attB järjestuste vahele). Plasmiid sisaldab ColE1 replikatsiooni origini järjestust, kanamütsiini (Km) resistentsusgeeni, polülimerit ja  $\Phi$ C31 integraasi äratundmisjärjestust attB ja attP. Lisaks sisaldab vektor 32 endonukleaasi *SecI* lõikekohta (Lisa 1A). pMC.BESPX-HPV18 on pärit labori kollektsioonist.
- **HPV-18 *minicircle* (mc)** - ligi 7,9 kbp suurune HPV-18 genoomikonstrukt, mis on kovalentselt suletud ja superspiraliseerunud (Lisa 1B).
- **pUC18** – kloneerimisvektor, kus asub multikloneerimissait (MCS – *multiple cloning site*), ampitsilliini (Amp/bla) resistentsusgeen, pMB1 replikatsiooni alguspunkt ja *lac Z* geen, mis kodeerib  $\beta$ -galaktosidaasi (Lisa 1C).
- **pUC-18URR** – HPV-18 URR-i sisaldav fragment (nukleotiidid 6929-124) lõigatud BamHI restriktasiga kloneerituna pUC-18 vektori BamHI saiti (Lisa 1D). pUC-18URR on pärit labori kollektsioonist.
- **pGL18URR-Luc** – *Firefly* lutsiferaasi reporterplasmiid, mis sisaldab kogu HPV-18 URR regiooni (Lisa 1E). pGL18URR-Luc on pärit labori kollektsioonist.
- **pRL-Tk** – kommertsiaalne plasmiid, mis sisaldab *Renilla reniformis*'est pärit lutsiferaasi geeni („Promega“) (Lisa 1F).
- **pUC-18-EcoRI-AatII** – pUC18 vektorist ja pMC.HPV-18 inserdist koosnev plasmiid, kuhu lisati pärast *PsyI* ja *MunI* ensüümidega E2 valgu mutatsioone sisaldavad fragmendid (Lisa 1G).

#### 2.1.2 Ekspressioonivektorid

- **pQMN18E2** – HPV-18 E2 valgu ekspressioonivektor, mis sisaldab E2 ORF-i, mille ees asub CMV (*cytomegalovirus*) promootor (Lisa 2A). pQMN18E2 on pärit labori kollektsioonist.
- **pM18-14** – HPV-18 E1 valgu ekspressioonivektor, mis sisaldab SV (Simian viirus 40) replikatsiooni alguskohta, polüA järjestust ja CMV promootorit (Lisa 2B). pM18-14 on pärit labori kollektsioonist.

### 2.1.3 Oligonukleotiidid

- **Ala Scan BamHI**

5' GCGGATCCAAGCTTCAGACACCGAAGGAAACCCTTTTCGG 3'

- **E2 Reverse Mun**

5' CACTGTCCCATGCTACATAGGTC 3'

### 2.1.4 Eukarüootsed rakuliinid

Kasutati osteosarkoomi rakkudest pärit eukarüootset rakuliini U2OS. Rakke kasvatati IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*) söötmel, mis sisaldas 10% veise loote seerumit, penitsilliini (100 ng/ml) ja streptomütsiini (100 ng/ml). Rakke inkubeeriti temperatuuril 37 °C kraadi ning 5% CO<sub>2</sub> sisaldusega inkubaatoris.

## 2.2 Metoodika

### 2.2.1 Kloneerimine

Kloneerimise etapid teostati firma Thermo Fisher Scientific ensüümide ja puhvritega vastavalt tootjapoolsetele protokollidele. Restriksioonianalüüsid viidi läbi ensüümidele sobivates puhvrites ja 37 °C juures vähemalt üks tund. Vektori 5' fosfaatrühmade eemaldamine DNA fragmentide kokkuminemise vältimiseks toimus ensüümi FastAP (aluseline fosfataas) töötlusega.

- DNA puhastamine agarosgeelist – DNA restriksioonifragmendid eraldati 0.8 – 1.2% 1xTAE puhvis (40 mM Tris-Atsetaat, 1 mM EDTA) olevast agarosgeelist pärast fragmentide lahutamist geelelektroforeesil. Vajalike fragmentide puhastamiseks kasutati NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up kit'i (Macherey-Nagel).
- DNA fragmentide ligatsioon – puhastatud DNA fragmente võeti suhtes 1:3 (vektor:insert). Fragmendid ligeeriti kuni 12 tunni jooksul temperatuuril 16 °C kasutades T4 ligaasi ja vastavat ligaasi puhvrit.
- Bakterite transformatsioon kuumaehmatuse (*heat shock*) meetodil - Plasmiidide paljundamiseks kasutati bakterirakkude transformatsiooni kuumaehmatuse (*heat shock*)

meetodil. Selleks lisati ligatsioonisegule 100 µl kompetentseid *E.coli* DH5α rakke ja segati. Segu hoiti 30 minutit jääl, seejärel inkubeeriti 1 minut temperatuuril 42 °C ning jahutati 1 minut jääl. Järgnevalt lisati rakkudele 1 ml LB söödet ja inkubeeriti 45 minutit temperatuuril 37 °C kraadi. Segust plaaditi 200 µl selektiivsöötmega tassile.

- Plasmiidse DNA eraldamine – selektiivsöötmega tassilt võeti koloonia ning pandi kasvama 3 ml LB-söötmesse, millele oli lisatud 100 µg/ml ampitsilliini või 50 µg/ml kanamütsiini. Rakke kasvatati temperatuuril 37 °C 16-18 tundi. Plasmiidse DNA eraldamiseks kasutati Plasmid DNA Extraction Mini Kit'i (Favorgen).

### **2.2.2 HPV-18 minicircle tootmine**

Kasutati M.Kay (Kay, He et al. 2010) labori poolt väljatöötatud *minicircle* tootmissüsteemi, mis põhineb kohtspetsiifilisel rekombinatsioonimehhanismil. Algplasmiid transformeeriti *E.coli* ZYCY103S2T tüve kompetentsetesse rakkudesse kuumaehmatuse meetodil ning plaaditi seejärel kanamütsiini (Km) selektiivsusega tassidele. Tekkinud kolooniatest pandi üks koloonia kasvama 10 ml LB söödet (50 µg/ml Km) sisaldavasse kolbi 37 °C 220 rpm (*rounds per minute*) juurde ning kasvatati 6 tundi. Seejärel lisati 100 µl starterkultuuri 10 ml TB söötmesse (50 µl/ml KM) ja kasvatati kuni OD-ni 4 temperatuuril 37 °C 220 rpm. Seejärel lisati induktsioonilahus (10 ml LB, 0.4 ml 1 M NaOH, 20 µl 20% L-arabinoos). Induktsioonilahusega indutseeriti bakteriogaagi ΦC31 integraasi vahendatud rekombinatsioon attB ja attP järjestuste vahel, millega eemaldatakse bakteris plasmidi paljundamiseks vajalik osa. Moodustuvad kovalentselt suletud superspiraliseerunud HPV plasmiidid. Bakterikultuuri kasvatati temperatuuril 32 °C 190 rpm 5-6 tundi. Bakterimass tsentrifuugiti põhja, eemaldati pealt sööde ning eraldati plasmiidne DNA NucleoBond® Xtra Midi/Maxi kit'iga.

### **2.2.3 Eukarüootsete rakkude transformatsioon elektroporatsiooni meetodil**

Plasmiidide viimiseks eukarüootsetesse rakkudesse kasutati elektroporatsiooni meetodit. Ühe poratsiooni kohta võeti üks 10 cm läbimõõduga U2OS rakkude tass, mis oli 80-90% konfluentsusega. Koekultuuri tassidelt aspireeriti sööde ning pesti 1x PBS lahusega. Rakkude eemaldamiseks pandi peale trüpsiin ning koguti rakud kokku söödet sisaldavasse 50 ml tsentrifuugi tuubi. Rakke tsentrifuugiti 5 min 1000 rpm temperatuuril 20 °C. Raku sademelt eemaldati sööde ning rakud võeti üles 250 µl söötmes ühe elektroporatsiooni kohta.



Rakususpensioon pipeteeriti küveti, kus oli rakku viidavate plasmiidide ja 50 µg kandja DNA (lõhe spermi DNA) segu. Elektroporatsioon viidi läbi pingel 220 V ja mahtuvusel 975 µF Bio-Rad Gene Pulser II elektroporatsiooni aparaadiga. Pärast transfektsiooni pesti rakud 2 ml söötmega tsentrifuugides 5 minutit 1000 rpm 20 °C. Rakusade resuspendeeriti ning külvati koekultuuri tassidele.

#### **2.2.4 Totaalse DNA eraldamine**

Rakke pesti 2 korda 1x PBS lahusega ning pandi peale 1 ml SOL IV lüsilahust (20mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.2% SDS) ja inkubeeriti rakke kuni moodustus viskoosne lüsaat. Lüsaat koguti kummispaatliga 2 ml tuubi ja lisati 5 µl proteinaas K-d (lõppkontsentratsioon 0.2 µg/µl). Lüsaat tõmmati 3x läbi süstla ning seejärel inkubeeriti temperatuuril 37 °C 12-18 tundi. Suspensioonile lisati juurde võrdne maht (1 ml) fenool-kloroformi 1:1 segu, segati *vortex*'il ning tsentrifuugiti 2 min 13 000 rpm. Ülemine vesifaas viidi uude tuubi ning DNA sadestati 2x ruumala 96% etanooliga 30 minutit temperatuuril -20 °C. Seejärel tsentrifuugiti 10 minutit 13 000 rpm 4 °C ning supernatant eemaldati. Kuivatatud sade resuspendeeriti 300 µl TE-s, mis sisaldas RNAasA-d lõppkontsentratsiooniga 20 µg/ml. Tuube segati 10 minutit tuubimikseril ning inkubeeriti 1 tund temperatuuril 37 °C. DNA sadestati 12 µl 5M NaCl-ga (lõppkontsentratsioon 200 mM) ja kahe mahu 96% etanooliga 30 minutit -20 °C juures. Järgmisena tsentrifuugiti 10 minutit 13 000 rpm 4 °C ning DNA sadet pesti 70% etanooliga, mille järel tsentrifuugiti 3 minutit 13 000 rpm. Sade kuivatati ja resuspendeeriti vastavalt sademe kogusele 30-200 µl TE-s ning mõõdeti DNA kontsentratsioon 260 nm lainepikkusel.

#### **2.2.5 Replikatsioonianalüüs *Southern blot* meetodil**

Totaalset DNA-d lõigati lineariseeriva ensüümiga ning ensüümiga DpnI, mis lõikab bakteriaalse metülatsoonimustriga eukarüootsetesse rakkudesse transfekteeitud DNA-d. Restriktsioonisegu inkubeeriti üleöö temperatuuril 37 °C kraadi. DNA lahutati geelelektroforeesil 0.8% agarosgeelis 1x TAE puhvril (40 mM Tris-atsetaat, 1 mM EDTA). Elektroforeesile järgnevalt denatureeriti geel 30 minutit lahuses SolA (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) ning neutraliseeriti lahuses SolB (1 M Tris-HCl pH 7.4, 1.5 M NaCl) 20 minutit. DNA ülekandumine geelilt filtrile 10x SSC lahuses toimus kapillaarse ülekandemeetodi kaudu. DNA seoti filtrile UV Stratalinker 1800 (Stratagene) abil. Mittespetsiifilise seondumise takistamiseks prehübridiseeriti filtrit esmalt prehübridisatsioonilahuses (6x SSC, 50x Denhardt,

0.5% SDS, 200 µg/ml eelnevalt denatureeritud lõhe spermi kandja DNA) 65°C kraadi juures vähemalt 30 minutit. Seejärel toimus hübridiseerimine spetsiifilise prooviga kasutades tootja juhendi järgi DecaLabel™ DNA Labeling Kit'i (Thermo Fisher Scientific) ja  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP-d. Hübridisatsioon toimus üleöö temperatuuril 65 °C kraadi. Hübridiseeritud filtrit pesti 2 korda 5 minutit pesulahusega I (2x SSC, 0,1% SDS), 1 kord 15 minutit pesulahusega II (1x SSC, 0,1% SDS) ja 2 korda 10 minutit pesulahusega III (0,1x SSC, 0,1% SDS). Hübridisatsioonisignaali detekteeriti filtri eksponeerimisega röntgenfilmile.

### **2.2.6 Western blot analüüsimeetod**

Rakkudelt eemaldati sööde ja pesti 2 korda 1xPBS lahusega. Plaatidele lisati 1 ml PBS-3mM EDTA lahust ning inkubeeriti plaate 10 minutit toatemperatuuril. Rakud suspendeeriti lahusesse ja kanti 1.5 ml tuubi ning eraldati 20 µl suspensioonist rakkude lugemiseks. Rakud loeti Invitrogen Countess Automated Cell Counter masinaga. Ülejäänud rakususpensioon fuugiti põhja 2 min 3000 rpm .

Peale tsentrifuugimist aspireeriti sööde ja rakud võeti üles 45 µl 1x PBS-is ja lüüsi 45 µl 2x *Laemmli* puhvris (100 mM Tris-HCl pH 6.8, 200 mM DTT, 4% SDS, 0,2% broomfenoolsisnine, 20% glütserool). Lüsaati kuumutati temperatuuril 100 °C 10 minutit ja fuugiti 13 000 rpm 10 minutit. Valgulüsaadid lahutati geelelektroforeesil 10% polüakrüülamiidgeelis 1xSDS puhvris (125 mM Tris, 0.96 M glütsiin, 0,5% SDS). Valgud kanti geelist üle 0.45 µm poori läbimõõduga PVDF filtrile (*Immobilon™*, Millipore) *semi dry* meetodil. Ülekanne toimus 30 minutit 15 V juures (TransBlot SD, Biorad). Peale ülekannet blokeeriti filter 5% lõssipulbri lahuses 1xPBS-is. Järgnevalt inkubeeriti filtrit tund aega 2% lõssipulbri lahuses, kuhu oli lisatud primaarne antikeha (küüliku polükloonaalne E2N antikeha 1:500 lahjendusega). Seejärel pesti filtrit kolm korda 10 minutit *Western blot* pesulahusega (50 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7.5, 0,1% Tween 20). Sekundaarse antikehana kasutati peroksüdaasiga konjugeeritud küüliku IgG vastast antikeha, mis lisati 2% lõssilahusesse lahjendusega 1:10 000. Filtrit inkubeeriti toatemperatuuril 1 tund ja pesti kolm korda 10 minutit *Western blot* pesulahusega. Detekteerimiseks kasutati ilmutuslahust TMB Stop Solution III (Biopanda Diagnostics).

### 2.2.7 Transkriptsiooni aktivatsiooni uurimise katse

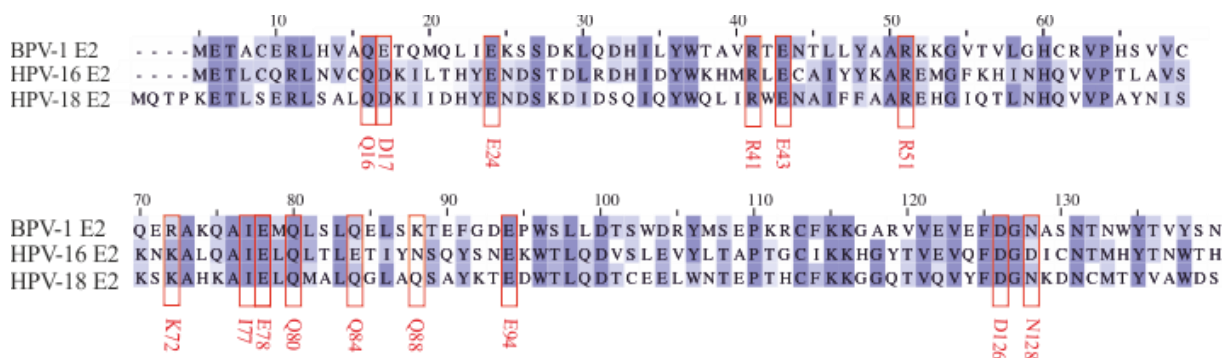
Transaktivatsiooni uurimiseks kasutati firma Promega *Dual-Luciferase Reporter Assay System Kit*'i. U2OS rakkudesse transfecteeriti 25 ng 18URR-Luc plasmidi, 30 ng pRL-Tk plasmidi ning uuritav kogus E2 valgu ekspressioonivektorit. 30h peale elektroporatsiooni eemaldati koekultuuri tassidelt sööde ja pesti 2 korda 1xPBS-ga. Rakud lüüsi 1xPLB-ga (*Passive Lysis Buffer*). 100 µl LAR II lahust (Luciferase Assay Reagent II) sisaldavatesse mikrotsentrifuugi tuubidesse lisati 20 µl rakulüsaati. LAR II on *Firefly* lutsiferaasi substraat. Tulemus mõõdeti Glomax 20/20 luminomeetriga (Turner Biosystems). *Firefly* lutsiferaasi aktiivsuse kustutamiseks ja *Renilla reniformis*'e lutsiferaasi aktiveerimiseks lisati samasse tuubi 100 µl *Stop&Glo Reagent*'i ning mõõdeti uuesti luminomeetriga. Saadud tulemusi analüüsi Microsoft Excel programmiga.

### 3. TULEMUSED

#### 3.1. Töö eesmärgid

E2 valk on vajalik läbi kogu viiruse elutsükli. E2 reguleerib viiruse transkriptsiooni seondudes viiruse genoomis asuvatele seondumisjärjestustele (Steger and Corbach 1997, Soeda, Ferran et al. 2006). Teiseks on E2 oluline faktor replikatsiooni initsiatsioonil (Ustav and Stenlund 1991, Ustav, Ustav et al. 1991). Kolmandaks vahendab E2 viiruse genoomi segregatsiooni tütarakkudesse (Piirsoo, Ustav et al. 1996). Just tema multifunktsionaalsuse tõttu on E2 valgu iseloomustamine ja uurimine tähtis papilloomiviiruse elutsükli mõistmiseks ning uute potentsiaalsete ravimikandidaatide leidmiseks. E2 valk koosneb kahest funktsionaalsest domeenist ja neid ühendavast *hinge* regioonist (joonis 5 ja 8A). Antud töös uuriti N-terminaalset transaktivatsioonidomeeni. N-terminaalne domeen on viirusel vajalik just replikatsiooniks, transaktivatsiooniks ja segregatsiooniks, sest antud piirkonnas asuvad domeenid, mis interakteeruvad viiruse E1 helikaasiga ning mitmete rakuliste valkudega (Ustav, Ustav et al. 1991, Abroi, Kurg et al. 1996, Bastien and McBride 2000).

Kirjanduses on kõige rohkem iseloomustatud BPV-1 E2 valku ja tema järjestuses paiknevate konserveerunud aminohapete mutatsioone ning nende toimet viiruse elutsüklile. Analüüsid on näidanud, et mitmed konserveerunud aminohappe jäägid on tähtsad nii transkriptsiooniks kui ka replikatsiooniks. Võrreldes BPV-1, HPV-16 ja HPV-18 E2 valke, siis neil on keskmiselt 30%-line sarnasus aminohappelises järjestuses. Joonisel 6 on toodud nende kolme viiruse subtüübi E2 valgu järjestuse joondus ning kõigis viirustes konserveerunud piirkonnad. Aminohappeline konserveeritus ning juba olemasolevad andmed HPV-16 ja BPV-1 aminohappe asenduste kohta võivad viidata sellele, et erinevad E2 valkude aktivatsioonidomeenid võivad jagada nii valgulist voltumist kui tegutsemismehhansmi (Abroi, Kurg et al. 1996, Ferguson and Botchan 1996, Harris and Botchan 1999, Abroi, Ilves et al. 2004).



**Joonis 6. Kolme papilloomiviiruse tüübi E2 valgu järjestuse joondus.** Joonisel on kujutatud BPV-1, HPV-16 ja HPB-18 E2 valgu N-terminaalse osa järjestuse joondus (1-139 AH). Tumatillaga on toodud ära kõigis kolmes viiruse tüübis konserveerunud ja heledamaga ainult kahes tüübis konserveerunud piirkonnad. Punaste kastidega on toodud ära HPV-18 E2 valku viidud aminohapete asenduste asukohad.

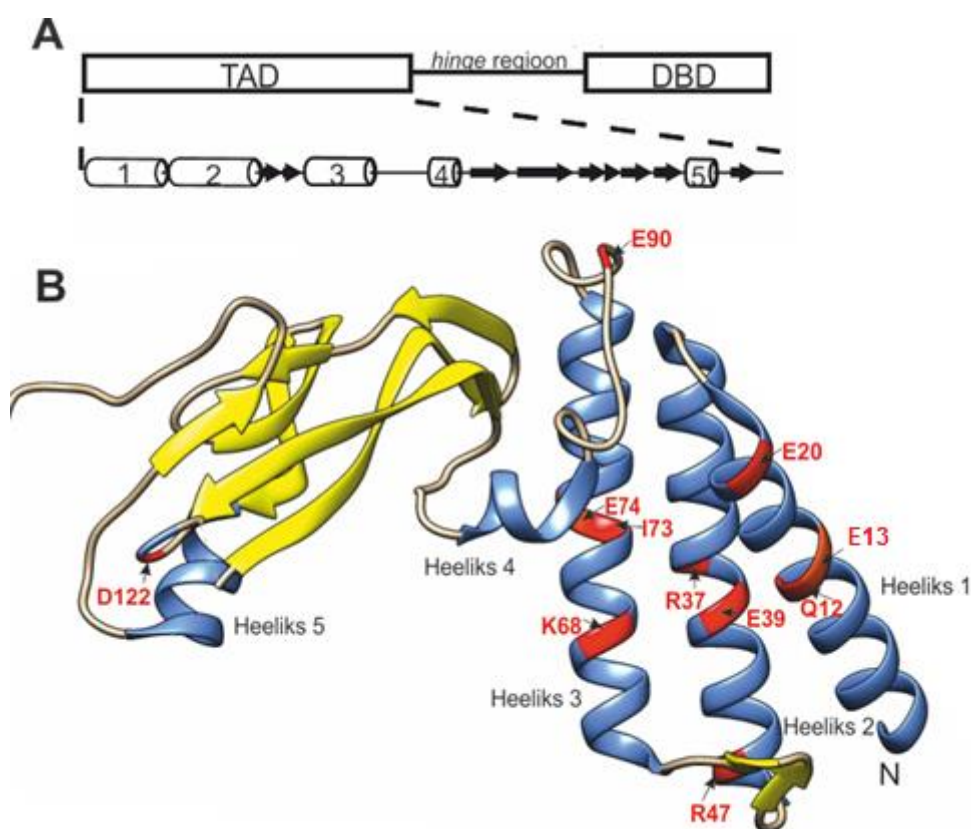
Käesoleva töö eesmärkideks oli:

- 1) Analüüsida ja disainida HPV-18 E2 valgu N-terminuse alaniini-asendusmutandid;
- 2) Konstrueerida E2 valgu kodeeriva järjestuse mutandid ning kloneerida need pQMN ekspressioonivektorisse ja pMC.BESPX-HPV18 *minicircle* genoomi algplasmidi;
- 3) Analüüsida mutantsete E2 ekspressioonivektorite võimet ekspresseeruda U2OS rakkudes;
- 4) Analüüsida E2 mutantide võimet toetada HPV-18 originplasmiidide transientset replikatsiooni U2OS rakkudes;
- 5) Analüüsida mutantsete E2 valkude toimet reguleerida HPV-18 URR piirkonnalt lähtuvat transkriptsiooni repressiooni või aktivatsiooni;
- 6) Uurida konstrueeritud E2 mutantide transientse replikatsiooni aktiivsust HPV-18 genoomi *minicircle* plasmiidide kontekstis U2OS rakkudes.

### 3.2. HPV-18 mutatsioonide valik ja konstrueerimine

Abroi, Kurg et al 1996 artiklis kirjeldati BPV-1 E2 valgu N-terminaalses osas paiknevate konserveerunud aminohappejääkide alaniiniasenduse mutageneesi. Sama meetodit kasutati HPV-16 E2 valgu uurimiseks. Mõlemate tööde korral tehti kindlaks mutatsioonid N-terminaalses domeenis, mis suudavad häirida kas transaktivatsiooni või siis DNA replikatsiooni funktsioone (Abroi, Kurg et al. 1996, Sakai, Yasugi et al. 1996). Antud töös uuriti sarnaseid aminohappeasendusi E2 valgu N-terminaalses domeenis ning nende mutatsioonide võimet mõjutada HPV-18 DNA replikatsiooni ja transkriptsiooni. Mutatsioonidel asendati tegelikult E2

järjestuses olev aminohapealaniiniga (Ala, A) (Joonis 7). Alaniini kasutatakse sellisel mutageneesil, kuna see eemaldab aminohappe kõrvalahela pärast  $\beta$  süsinikku ning ei muuda peahela konformatsiooni ega oma elektrostaatilisi või steerilisi efekte. Lisaks on alaniin üks kõige sagedamini esinev aminohape. Alaniini mutagenees (*alanine-scanning mutagenesis*) on süstemaatiline analüüs, mille käigus luuakse mutantsed valgud, millega saab analüüsida kindlates positsioonides olevate aminohapete mõju valgu funktsioonidele (Cunningham and Wells 1989).



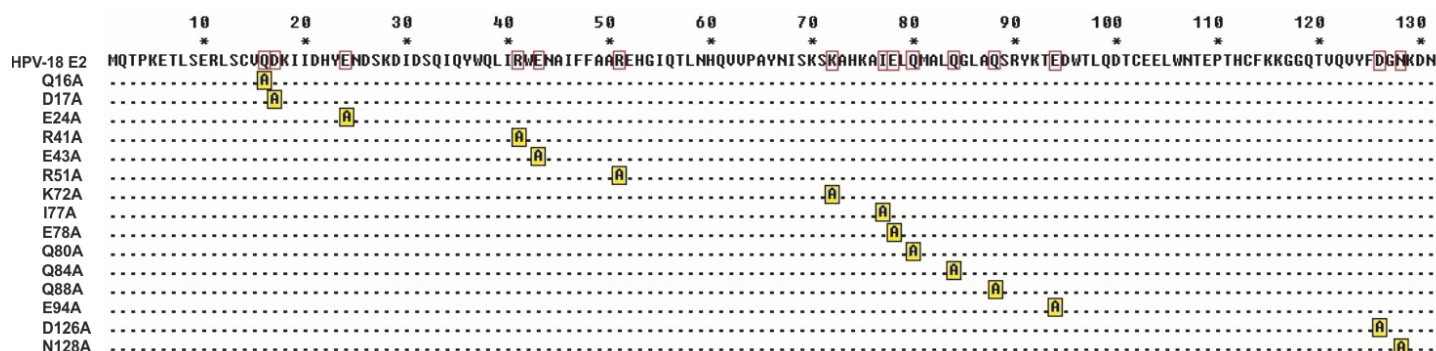
**Joonis 8. E2 valgu struktuur.** (A) E2 valgu kolm eristatavat domeeni: transaktiivatsioonidomeen (TAD), *hinge* regioon ja DNA-d seondav domeen (DBD). Toodud on välja TAD domeeni sekundaarstruktuur graafiliselt (silinder –  $\alpha$ -heeliks, nool –  $\beta$ -leht) (kasutatud Abroi, Ilves et al 2004). (B) HPV-16 E2 valgu täispikk TAD struktuur, kus on välja toodud  $\beta$ -lehed (kollane) ja nummerdatud E2 valgu  $\alpha$ -heeliksid (sinine). Punasega on välja toodud HPV-16 E2 valku viidud alaniini mutatsioonide asukohad, mida oli iseloomustanud Sakai, Yasugi et al. 1996 ja Abroi, Kurg et al. 1996 artiklis. Struktuur loodi programmiga Chimera.

HPV-18 E2 valgu järjestuse aminohappeasendused valiti kolme papilloomiviiruse tüübi BPV-1, HPV-16 ja HPV-18 E2 valgu järjestuse võrdluse alusel (Joonis 6) ning BPV-1 ja HPV-16 viiruse mutantide juba olemasolevate iseloomustuste põhjal. Joonisel 8B on näha HPV-16 valgu sekundaarstruktuuri, kus on ära toodud juba iseloomustatud mutatsioonide asukohad. HPV-16 ja BPV-1 konserveerunud aminohappeasenduste võrdluses on näha, et kui teha asendusi E2 valgu N-terminaalse osa alguses esimeses alfa-heeliksis asuvates konserveerunud positsioonides (Q12, E13 ja E20), siis BPV-1-l ei muutu valgu bioloogiline funktsioon ning valk käitub sarnaselt metsiktüüpi valguga (*wild type* – wt). Kui tehtialaniini asendus BPV-1 E2 teise alfa-heeliksi positsioonidesse E39 ja R47, siis see ei avaldanud valgu aktiivsusele suurt mõju. E39A asendus HPV-16-l represseeris aga replikatsiooni. R37A mutant ei suutnud aktiveerida transkriptsiooni, kuid osales replikasioonil. Kolmandas alfa-heeliksis on BPV-1 tehtud mutatsioonid positsioonidesse R68, I73 ja E74. R68A mutatsioon ei omanud väga suuri muutusi E2 valgu funktsioonides. I74A oli transkriptsiooniliselt inaktiivne, kuid funktsioneeris mingil määral replikatsioonis (Tabel 1) (Abroi, Kurg et al. 1996, Sakai, Yasugi et al. 1996).

HPV-18	BPV-1	Mutatsiooni tagajärg	HPV-16	Mutatsiooni tagajärg
<b>Q16A</b>	Q12A		Q12A	
<b>D17A</b>	E13A	Ei muuda valgu aktiivsust	E13A	n/a
<b>E24A</b>	E20A		E20	
<b>R41A</b>	R37A	Ei suuda aktiveerida transkriptsiooni, replikatsioon toimub	R37A	Ei suuda aktiveerida transkriptsiooni, replikatsioon toimub
<b>E43A</b>	E39A	Ei muuda valgu aktiivsust	E39A	Ei suuda replitseeruda
<b>R51A</b>	R47A		R47A	Ei muuda valgu aktiivsust
<b>K72A</b>	R68A	Ei muuda valgu aktiivsust	K68A	Ei muuda valgu aktiivsust
<b>I77A</b>	I73A	Transaktivatsiooni võime vähenenud	I73A	Ei suuda aktiveerida transkriptsiooni, replikatsioon toimub
<b>E78A</b>	E74A	Ei suuda aktiveerida transkriptsiooni, replikatsioon toimub	E74A	n/a
<b>E94A</b>	E90A	Aktiveerib replikatsiooni	E90A	Ei muuda valgu aktiivsust
<b>D126A</b>	D122A	Ei suuda aktiveerida transkriptsiooni	D122A	Transaktivatsiooni võime vähenenud, replikatsioon toimub

**Tabel 1. BPV-1 ja HPV-16alaniin-asendus mutantide võrdlus.** Antud tabelis on eelnevate andmete põhjal võrreldud BPV-1 ja HPV-16 E2 N-terminaalsesse ossa viidudalaniiniasenduste mutantide funktsioone transaktivatsioonil ja replikatsioonil (Abroi, Kurg et al. 1996, Sakai, Yasugi et al. 1996).

Antud töös tehti kokku 15 alaniini asendusega mutanti (joonis 7).



**Joonis 7. HPV-18 E2 valgu alaniini-asendus mutandid.**

HPV-18 mutatsioonid positsioonides **Q16**, **D17**, **E24**, **R41**, **E43**, **R51**, **K72**, **I77**, **E78**, **E94** ja **D126** võeti BPV-1 ja HPV-16 iseloomustatud mutatsioonide alusel, et oleks võimalik võrrelda kindlate asenduste mõju erinevatele papilloomiviiruse subtüüpidele. Mutatsioonid positsioonides **Q80**, **Q84** ja **Q88** tehti, et uurida HPV-18 kolmandas  $\alpha$ -heeliksis paiknevate kolme glutamiini (Gln, Q) (Joonis 9) alaniini asenduste mõju transkriptsioonile ja replikatsioonile. Eelnevalt on näidatud, et mida lähemal on alaniini asendus  $\text{NH}_2$ -terminaalsele regioonile heeliksis, siis seda tugevamaks muutub efekt transkriptsioonile (Harris and Botchan 1999). Positsiooni **N128** ei ole veel iseloomustatud, kuid ta on konserveerunud HPV tüüpidel 16 ja 18 ning seega taheti vaadata, kas sellel mutatsioonis on mõju replikatsioonile ja transkriptsioonile.



**Joonis 9. Alaniini asendused Q80, Q84 ja Q88.** HPV-18 E2 N-terminaalse osa kolmanda  $\alpha$ -heeliksis paiknevate kolme glutamiini jäägi (Q80, Q84 ja Q88) asukohad. Joonis tehtud programmiga Chimera.



### 3.2.1. HPV-18 alaniini-asendus mutantide kloneerimine

Alaniini-asendusmutatsioonid kandvad DNA fragmendid sünteesiti firmas Genewiz. Konstruktide loomiseks kloneeriti nn emaplasmiid, kuhu sisestati sünteesitud fragmendid. Selleks võeti pMC.HPV-18 genoom (genoomikaart Lisa 1A) ning lõigati EcoRI ja AatII ensüümidega. pUC18 vektorplasmidi (genoomikaart Lisa 1C) lõigati samade ensüümidega. pMC.HPV-18 fragment kloneeriti pUC18-vektoris, mis kannab efektiivseks DNA replikatsiooniks ja bakterirakkudes säilimiseks vajalikku järjestust. Tekkinud pUC18-EcoRI-AatII vektorplasmidi (genoomikaart Lisa 1G) lõigati PstI ja MunI restriksiooniesnõümidega ning kanti sinna kanti mutatsioonid sisaldavad PstI-MunI fragmendid.

- Mutantide kloneerimine pQMN-18E2 ekspressioonivektoris

Uurimaks alaniini-asendusmutantide mõju transientsse replikatsioonile ja transaktivatsioonile, konstrueeriti 15 ekspressioonivektori mutanti. E2 ekspressioonivektorina kasutati pQMN-18E2 ekspressioonivektorit, mis sisaldab E2 valguga ORF-i, mille ees asub CMV promootor (Lisa 2A).

K72A, I77A, E78A, Q80A, Q84A, Q88A, E94A, D126A ja N128A pUC-18-EcoRI-AatII vektorplasmidide lõigati SexAI ja MunI restriksioonidega ning kloneeriti pQMN-18E2 ekspressioonivektoris (lõigatud SexAI-MunI).

Q16A, D17A, E24A, Q41A, E43A ja R51A ekspressioonikonstruktide saamiseks telliti firmast Microsynth sünteetilised oligonukleotiidid (Ala Scan BamHI ja E2 Reverse Mun, 2.1.3 Oligonukleotiidid) (praimerid disainitud programmiga CloneManager) ning viidi läbi PCR. PCRprodukte ning pQMN-18E2 ekspressioonivektorit lõigati BamHI ja MunI ensüümidega ning lüüsi.

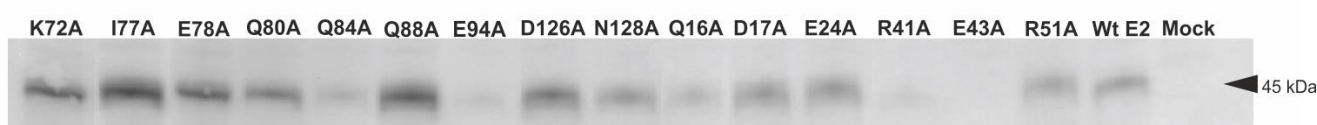
- Mutantide kloneerimine HPV-18 minicircle (mc) algplasmidi

Uurimaks alaniini-asendusmutantide mõju genoomi üldisele replikatsioonile konstrueeriti 13 HPV-18 minicircle algplasmidi konstrukti. HpaI ja AatII ensüümidega lõigatud pUC-18-EcoRI-AatII mutatsioonid sisaldavate plasmidide fragmendid kloneeriti pMC-HPV18 algplasmidi ning toodeti saadud plasmididest minicircle'd (vt 2.2.2 HPV-18 minicircle tootmine). Kahe mutandi, **Q16A** ja **E24A**, kloneerimine ei õnnestunud.

Kõik loodud konstruktid (ekspressioonivektorid ja minicircle konstruktid) sekveneeriti, et kontrollida uuritava mutatsiooni olemasolu.

### 3.3. Mutantsete valkude ekspressioon

Valgu primaarstruktuuri muutumisel võib muutuda ka valgu stabiilsus. Mutantide stabiilsuse ja suhtelise ekspressioonivõime kontrollimiseks viidi U2OS rakkudesse elektroporatsiooni teel E2 ekspressioonivektorid (1 µg), negatiivse kontrollina kasutati ainult kandja-DNA-ga transfekteeitud rakke (mock). Rakud lüüsi 24h möödudes ning valkude ekspressiooni taset kontrolliti *Western blot* analüüsiga (Joonis 10). *Western blot* analüüsiks kasutati küüliku polükloonaalset E2C antikeha. Kõiki mutante, peale E43A, oli võimalik detekteerida võrreldes HPV-18 *wildtype* (wt) E2 valgu tasemega. See viitab, et konstrueeritud mutandid on stabiilsed ja ekspresseeruvad antud rakuliinis.

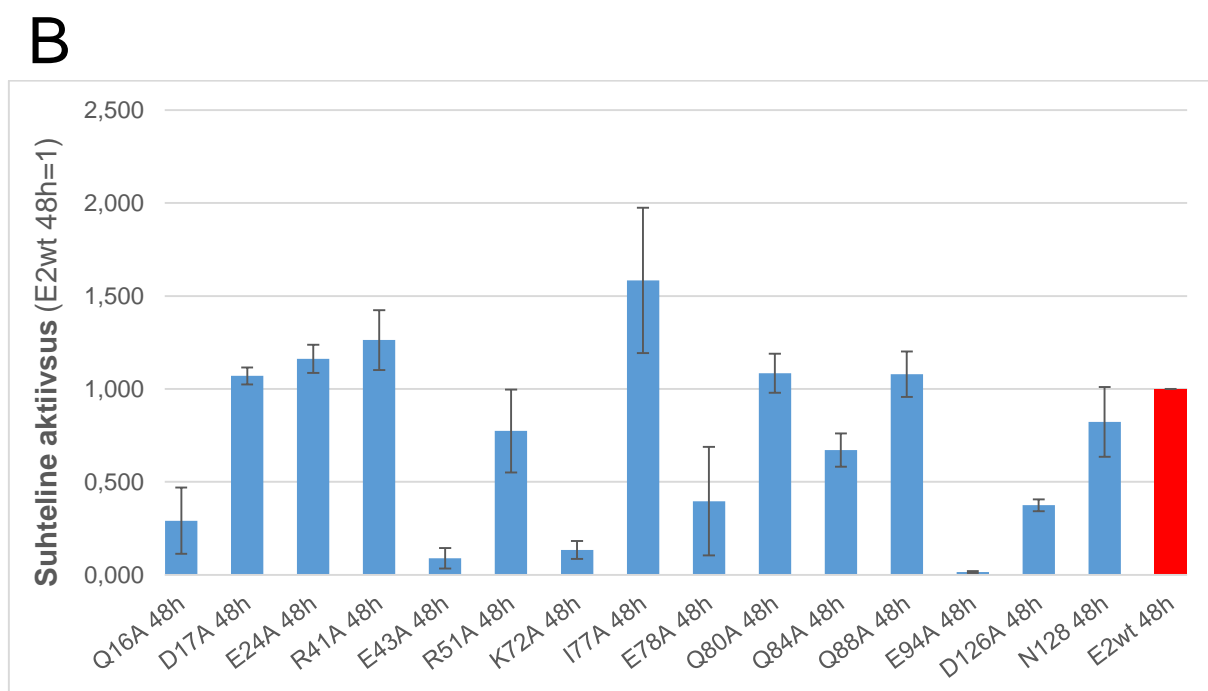
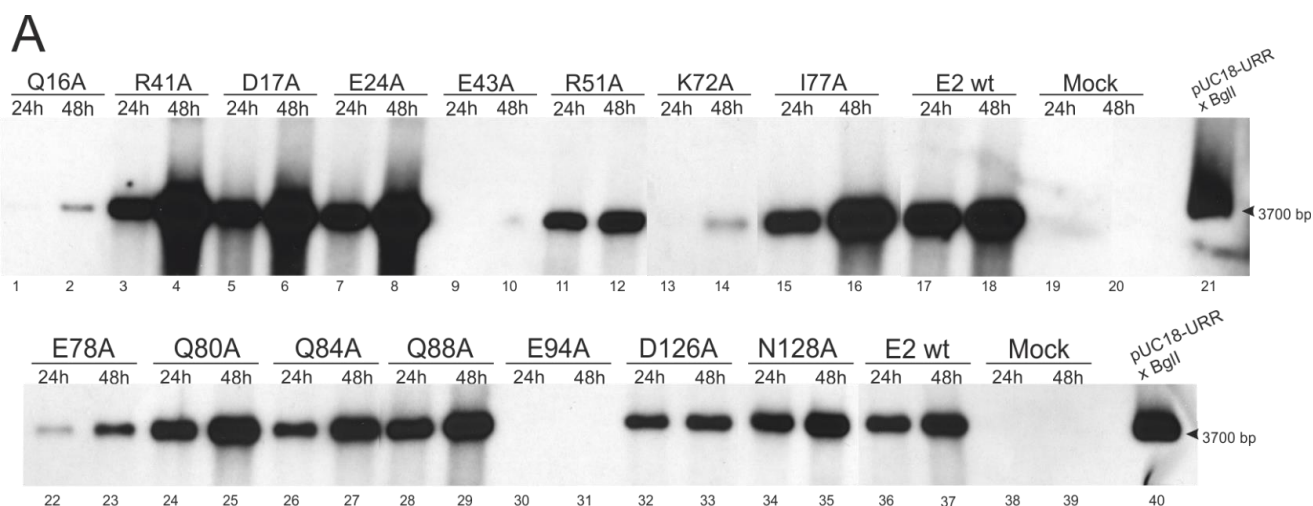


**Joonis 10. E2 valkude ekspressioonianalüüs U2OS rakkudes *Western blot* meetodiga.**

U2OS rakkudesse viidi elektroporatsiooni teel 1 µg E2 ekspressioonivektorit. *Western blot* meetodiga analüüsiti sama hulk U2OS rakkudest eraldatud totaalselt rakuekstrakti. Detekteerimiseks kasutati küüliku polükloonaalset E2C terminaalset antikeha. Toodud on 15 E2 valgu mutandi, HPV-18 E2 wt valgu ning negatiivse kontroll-DNA (*mock*) ekspressiooni võrdlus. Noolega on märgitud HPV-18 valgu suurus (~ 45 kDa).

### 3.4. Mutantsete valkude transientne replikatsioon

Papilloomiviiruste transientseks replikatsiooniks piisab rakkudesse replikatsiooni origini sisaldava plasmidi viimisest ning E1 ja E2 valkude ekspressioonist vastavalt ekspressioonivektoritelt (Ustav and Stenlund 1991). Uurimaks, kuidas muteeritud E2 valgud suudavad toetada papilloomiviiruse DNA replikatsiooni, siis kotransfekteeiti U2OS rakkudesse E1 ja E2 ekspressioonivektorid koos HPV18 replikatsiooni alguspunkti sisaldava pUC-18URR plasmidiga. 24h ja 48h tunni möödudes eraldati rakkudest totaalne DNA ning viidi läbi replikatsioonianalüüs *Southern blot* meetodil. Eelnevalt töödeldi DNA-d lineariseeriva HindIII ensüümiga ning DpnI ensüümiga, mis lõikab ainult bakteriaalse metülatsoonimustriga rakkudesse transfekteeitud DNA-d. Hübridisatsiooniproovina kasutati lineariseeritud pUC-18URR  $\alpha^{32}$ -dCTP märgistatud proovi (Joonis 11).



**Joonis 11. E2 ekspressioonivektorite transientse replikatsiooni analüüs.**

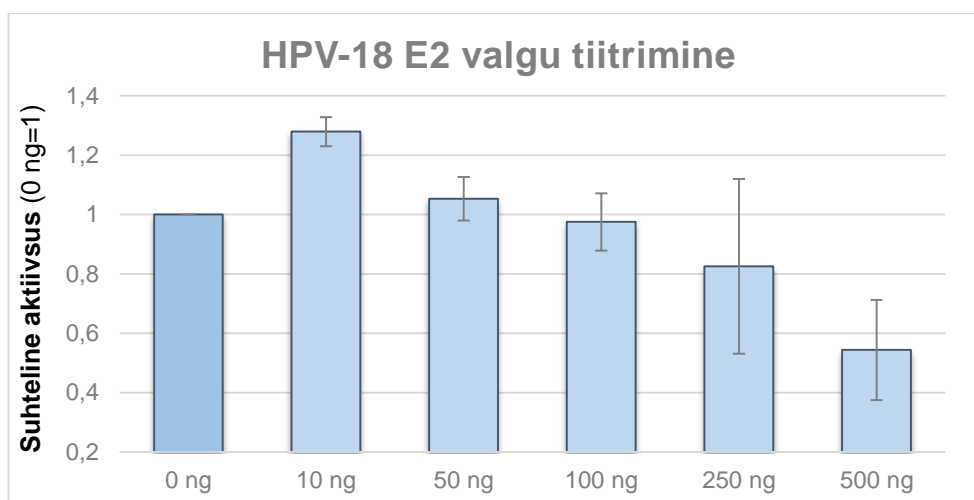
(A) U2OS rakkudes sisestati elektroporatsiooni teel koos kandja DNA-ga 25 ng E1 ekspressioonivektorit pM.18-14, 25 ng E2 ekspressioonivektorit ja 100 ng replikatsiooni origini sisaldavat pUC-18URR plasmidi. Eraldatud totaalsest DNA-st lineariseeriti 2 µg HindIII ensüümiga ning analüüsiti *Southern blot* meetodiga. Hübridisatsiooniprooviks oli  $\alpha^{32}$ -dCTP märgistatud pUC-18URR lineaarne genoom. Rajal 21 ja 40 on markerina pUC-18URR lineaarne genoom (3700 bp, näidatud noolega).

(B) E2 mutantide transientse replikatsioonianalüüsi kvantiteerimine. Replitseerunud DNA signaal kvantiteeriti PhosphoImager Typhoon masinaga (GE Healthcare). Tulemused normaliseeriti wt E2 valguga 48h ajapunkti replikatsiooniaktiivsuse suhtes ning esitati vaid 48h punkti andmed. Esitatud on kahe eksperimendi keskmised väärtused koos standardhälvetega.

Joonisel 11A on esitatud *Southern blot* replikatsioonianalüüsi tulemused, kus on näha origini sisaldava plasmidi replikatsiooni signaali (osutatud noolega) suuremal osal testitud E2 mutantidest. Väga nõrgalt toetasid replikatsiooni mutandid Q16A, E43A ja K72A (vastavalt rajad 1-2, 9-10 ja 13-14) ekspresseerituna vastavatelt ekspressioonivektoritelt. Replikatsioonisignaali ei tuvastatud mutandil E94A (rajad 30-31). Saamaks täpsemat informatsiooni, kvantiteeriti tulemused E2 wt valgu replikatiivse aktiivsuse suhtes 48 tunni möödumisel transfektsioonist. Tulemustest on näha, et eespool nimetatud mutandid toetavad replikatsiooni kuni 10 korda vähem kui E2 wt valk. Madal aktiivsus võib viidata sellele, et antud aminohappejäägid omavad olulist rolli HPV-18 replikatsioonifunktsioonis. E78A ja D126A toetasid replikatsiooni umbes 2 korda vähem kui wt ekspressioonivektorit kasutades. Ülejäänud aminohappeasendustega E2 valgud toetasid replikatsiooni võrreldes E2 wt-ga umbes samal määral.

### **3.5. E2 valgu tiitrimine transkriptsioonianalüüsi jaoks**

Enne, kui asuti uurima E2 mutantide transaktivatsiooni võimet, oli vaja kindlaks teha parim rakkudesse viidava DNA kontsentratsioonivahemik transkriptsiooni katse jaoks. Et kindlaks teha, kuidas mõjutavad E2 valgu ekspressioonivektorite erinevad kontsentratsioonid transkriptsiooni URR promootorilt, siis viidi elektroporatsiooni teel U2OS rakkudesse erinevad kogused HPV-18 E2 wt ekspressioonivektorit ning plasmiidid 18URR-Luc ning pRL-Tk. 18URR-Luc sisaldab täispikkuses HPV-18 URR regiooni promooterina *Firefly* lutsiferaasi ekspressiooniks. pRL-Tk on mittespetsiifiline reporter, mis sisaldab *Renilla* lutsiferaasi geeni, mida kasutatakse normaliseerimiskontrollina. Täispikkuses HPV-18 E2 valk käitub transkriptsiooni inhibiitorina ning seondudes tugevale URR-paiknevale promooterile inhibeeritakse transkriptsiooni ja lutsiferaasi aktiivsus väheneb. 30h pärast elektroporatsiooni mõõdeti nii *Firefly* kui *Renilla* lutsiferaasi aktiivsuse tasemed. Erinevate E2 kontsentratsioonide efektid esitati URR-Luc baasaktiivsuse suhtes (Mock, 0 ng E2) (Joonis 12).

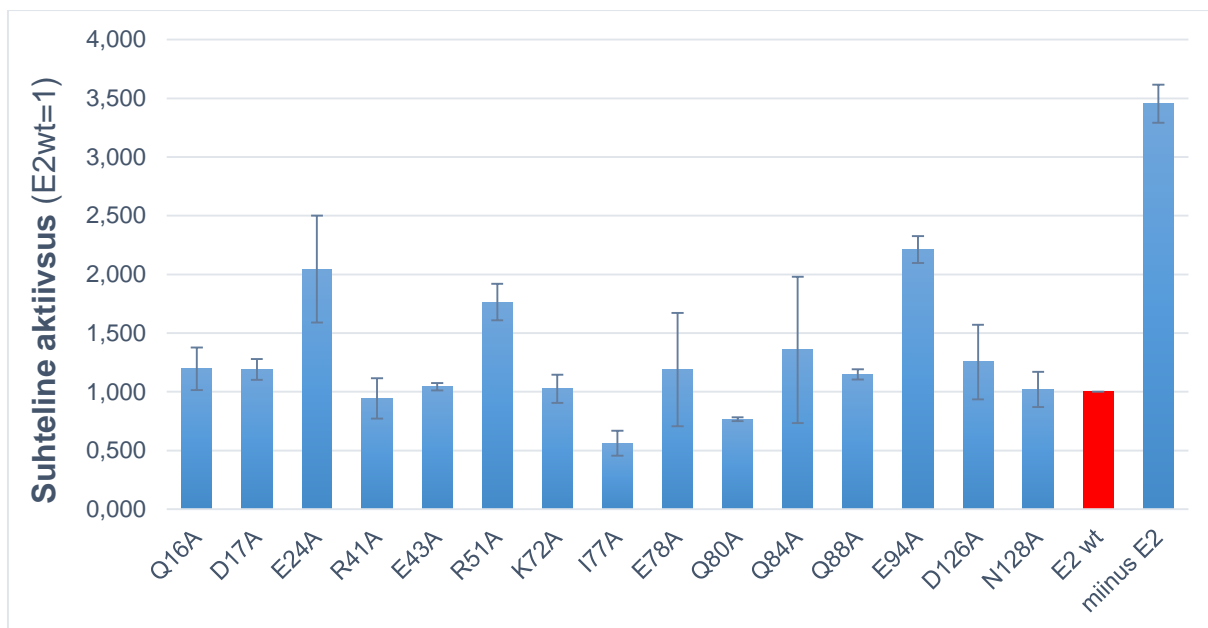


**Joonis 12. E2 valgu tiitrimine.** U2OS rakkudesse viidi elektroporatsiooni teel koos kandja DNA-ga 25 ng 18URR-Luc plasmidi ja 30 ng mittespetsiifilist pRL-Tk reporterit koos HPV-18 E2 erinevate kontsentratsioonidega (0 ng, 10 ng, 50 ng, 100 ng, 250 ng, 500 ng). 30h pärast transfektsiooni mõõdeti lutsiferaasi aktiivsused ja normaliseeriti pRL-Tk plasmidilt saadud Renilla lutsiferaasi väärtuste vastu. Erinevate kontsentratsioonide efektid esitati 0 ng E2 ekspressiooniplasmidi mõõtetulemuse baasväärtuse vastu. Esitatud on kahe eksperimendi keskmised väärtused koos standardhälvetega.

E2 kogused ekspressioonivektori vastavate hulkadelt 100, 250 ja 500 ng käitusid kõik transkriptsiooni inhibiitorina ning surusid URR järjestusele seondudes maha *Firefly* lutsiferaasi ekspressiooni. 50 ng siseporeeritud ekspressioonivektorit jäi väheseks ja oli samalaadne 0 ng E2-ga (vektorita=mock). Võrreldes 0 ng E2-ga oli ligi kahekordne transkriptsiooni mahasurumise võime 500 ng E2 ekspressioonivektori kasutusel, seega otsustati järgnevates katsetes kasutada E2 wt ja mutantidele vastavaid ekspressioonivektorite 500 ng-seid koguseid.

### 3.6. E2 valgu mutandid transaktivatsioonis

Uurimaks E2 valgu mutantide transaktivatsioonivõimet, siis viidi U2OS rakkudesse 18URR-Luc ja pRL-Tk plasmiidid ning lisaks 500 ng ekspressioonivektoreid, mis ekspresseerisid E2 mutante või *wt* HPV-18 E2-te. E2 ekspressiooniplasmidi hulk 500 ng määrati eelnevalt kindlaks E2 vektorite tiitrimisel ning sellel oli kõige suurem võime inhibeerida transkriptsiooni uuritud ajahetkel. 30 h pärast elektroporatsiooni lüüsi rakud ning mõõdeti *Firefly* ja *Renilla* lutsiferaasi aktiivsused luminomeetriga. E2-sõltuva *Firefly* lutsiferaasi ekspressioon normaliseeriti E2-st mittesõltuva *Renilla* lutsiferaasi ekspressiooni suhtes ning tulemused esitati metsiktüüpi E2 aktiivsusega võrreldes (500 ng E2 wt) (Joonis 13).



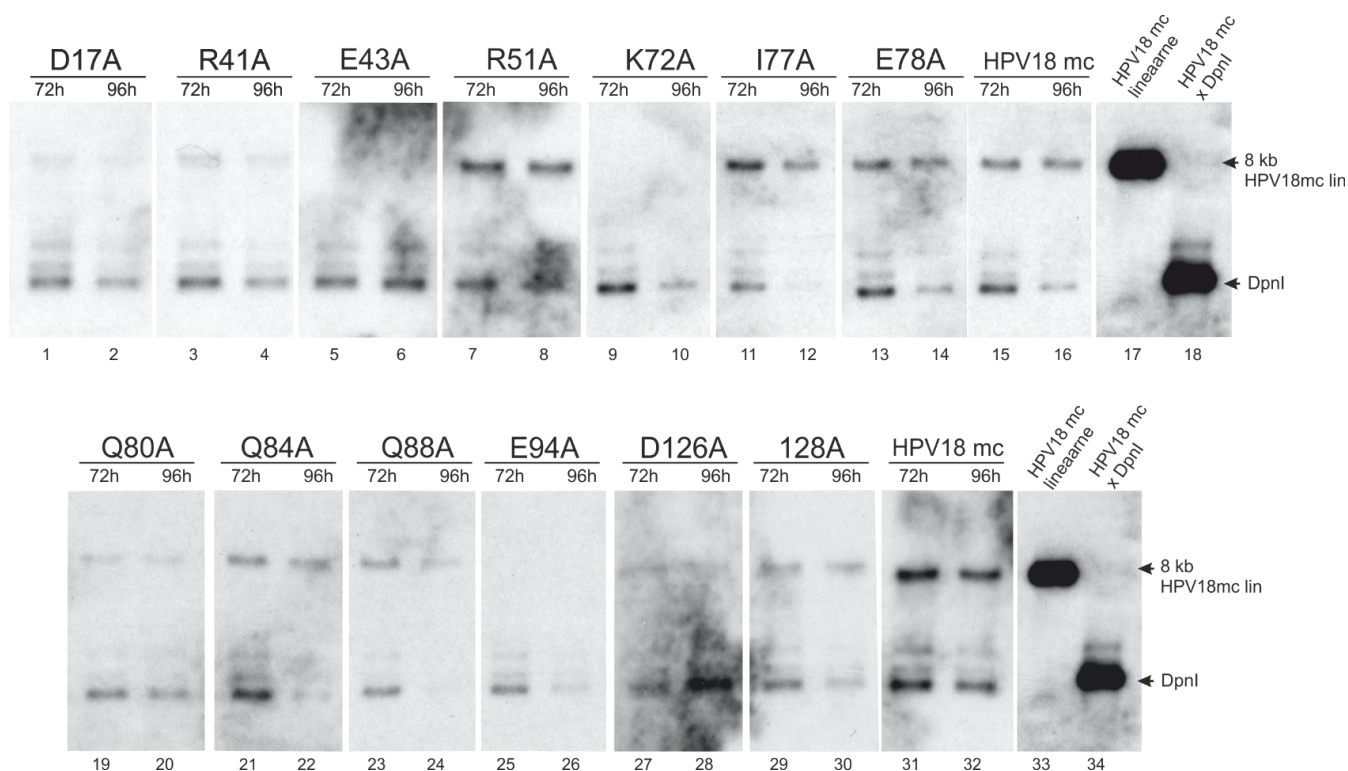
**Joonis 13. HPV-18-lutsiferaasi reporteri transaktivatsioon.** U2OS rakkudesse transfekteeeriti elektroporatsiooni teel koos kandja DNA-ga HPV-18 täispikka URR-i sisaldav 18URR-Luc plasmiid (25 ng) ning mittespetsiifiline reporter pRL-Tk (30 ng) ja 500 ng E2 ekspressioonivektoreid mutantide või wt E2 tarvis. 30h möödudes valmistati rakulüsaadid ning mõõdeti lutsiferaasi aktiivsused. Lutsiferaasi aktiivsused normaliseeriti *Renilla* lutsiferaasi suhtes, mille ekspressioon pärines mittespetsiifiliselt pRL-Tk promooterilt. Andmed on esitatud kui mutantide aktiivsused wt E2 aktiivsuse suhtes. Graafikul on toodud kahe eraldiseisva transfektsiooni keskmised tulemused ja standardhälbed.

HPV E2 valgud käituvad repressorina ning seega võeti võrdluse aluseks E2 wt vahendatud promooteri aktiivsus, et saaks selle suhtes võrrelda mutantide transkriptsioonivõimet. Mida väiksem on suhteline aktiivsus E2 wt suhtes, seda tugevamini represserib mutant transkriptsiooni. E2 wt represseris transkriptsiooni ligi 2,5 korda rohkem kui E2 miinus proov, kus transfekteeeriti vaid kaks lutsiferaasi reporterit. Katsetest saadud tulemused on esitatud joonisel 13. Kõige tugevamini surus transkriptsiooni URR promooterilt maha asendus I77A, mille inhibitoorne mõju oli ligi kaks korda tugevam wt E2 valgu omast. Võrreldes E2 miinus proovi efektiivsusega, represseris I77A transkriptsiooni 3 korda rohkem. E2 wt aktiivsusest oli veel väiksem Q80A. Ligi kaks korda väiksem repressioonivõime oli mutantidel E24A, R51A ja E94A. Ülejäänud mutandid reguleerisid transkriptsiooni E2 valguga umbes samal tasemel.

### 3.7. HPV-18 E2 mutantsete *minicircle*'te replikatsioon

Lisaks ekspressioonikonstruktidele kloneeriti E2 mutantset valgujärjestused ka HPV-18 *minicircle* konstrukti. *Minicircle* konstruktid on kovalentselt suletud superspiraliseerunud HPV rõngasmolekulid, mis sarnanevad rakku siseneva looduses esineva HPV DNA-ga. Neil on näidatud parem valguekspressioon ja kõrgem transfektsiooniefektiivsus, kuna neil on rekombinatsiooni abil eemaldatud bakteriaalseks replikatsiooniks ja selektsiooniks vajalikud järjestused ning ka nende plasmiidide suurus segava järjestuseta on väiksem. Samuti on varasemalt näidatud *minicircle* HPV genoomidel võime jääda rakkudes stabiilselt replitseerima (Chabot, Orio et al. 2013). Konstrueeritud *minicircle* plasmiidid annavad võimaluse uurida genoomi transientse replikatsiooni sõltuvust E2 valgu mutantsete asenduste korral ning edaspidi ka mõju stabiilsele replikatsioonile.

Genoomi replikatsiooni uurimiseks viidi elektroporatsiooni teel U2OS rakkudesse erinevad HPV-18 *minicircle* konstruktid E2 mutantsete järjestustega. 72h ja 96h möödudes eraldati rakkudest totaalne DNA. Replikatsioonianalüüsiks *Southern blot* meetodil töödeldi totaalset DNA-d BglI lineariseeriva restriктаasiga ning DpnI-ga. Hübridisatsiooniproovina kasutati HPV-18 *minicircle* lineaarset  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP märgistatud proovi.



**Joonis 14. HPV-18 mutantsete *minicircle*'te transientne replikatsioon.**

U2OS rakkudesse sisestati elektroporatsiooni teel koos kandja DNA-ga 1µg HPV-18 *minicircle* plasmide. Replikatsiooniproduktide teket jälgiti 72h ja 96h ajapunktides. Analüüsi tarbeks eraldati rakkudest totaalne DNA. DNA lineariseerimiseks lõigati eraldatud DNA-d BglI ensüümiga ning DpnI-ga ja 2µg analüüsiti *Southern blot* meetodil. Hübridisatsiooniproovina kasutati HPV-18 *minicircle* lineaarset genoomi  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP märgisega. Ülemine signaal on 8 kb suurune lineaarsele HPV-18 genoomile vastav replikatsioonisignaal ja alumine signaal on bakteriaalse päritoluga rakkudesse viidud DNA, mille hulk ajas väheneb. Markeriteks on lineariseeritud HPV-18 genoom ja DpnI-ga lõigatud HPV-18 genoom (vastavalt rajad 17 ja 33, 18 ja 34).

Joonisel 14 on toodud muteeritud E2 järjestusi sisaldavate HPV-18 *minicircle*'te transientse replikatsiooni signaalid. Tuvastatav ei ole mutantide E43A, K72A ja E94A replikatsioonisignaal (rajad 5-6, 9-10 ja 25-26), mis on vastavuses negatiivse replikatsioonifunktsiooniga samade E2 mutantide korral vastavate ekspressioonivektorite kasutamisel (Joonis 11). Ülejäänud HPV-18 E2 mutandid, ekspresseerudes *minicircle* kontekstis, töötasid replikatsioonis umbes samal tasemel kui HPV-18 E2 wt. Mõnevõrra nõrgemad olid D17A, R41A ja Q80A (rajad 1-2, 3-4 ja 19-20). Kahjuks ei olnud võimalik testida mutante Q16A ja E24A, mille kloneerimine *minicircle* kontekstis ei õnnestunud teadmata põhjustel. Siiski on BPV-1-l näidatud, et vastavad mutantsed järjestused ei mõjuta E2 valgu replikatiivset aktiivsust. Sellele annab toetust ka ekspressioonivektorite kasutusega transientse replikatsioonikatse tulemused, kus Q16A ja E24A toetasid replikatsiooni.



## ARUTELU

Papilloomiviiruse E2 valgul on viiruse elutsükli võtmeroll. Ta osaleb viiruse DNA replikatsiooni initsiatsioonil, reguleerib viiruse geenide transkriptsiooni ning on oluliseks faktoriks viiruse genoomi segregatsioonil ning episomaalsel säilimisel. Kõikidel nendel funktsioonidel on E2 valgul oluliseks osaks N-terminaalne transaktivatsioonidomeen. Eelnevalt on iseloomustatud BPV-1 ja HPV-16 mutatsioone selles piirkonnas ning on näidatud, et mutatsioonid antud domeenis võivad kahjustada replikatsiooni ja transaktivatsiooni funktsioone.

Sarnaselt HPV-16-nele on ka HPV-18 kõrgeriski papilloomiviiruse tüüp ja võib põhjustada emakakaelvähi teket. Et saada paremat ülevaadet lisaks HPV-16-nele ka HPV-18 E2 transaktivatsioonidomeenist, konstrueeriti 15 HPV-18 E2 alaniini-asendusmutanti, et uurida valitud aminohapete mõju viiruse replikatsiooni- ja transkriptsioonivõimele. Alaniini asendus tavaliselt ei tekita valgusstruktuurilisi muutusi ega muuda valgusekspressiooni. Asendatavad aminohapped valiti toetudes eelnevatele andmetele BPV-1 ja HPV-16 N-terminaalse domeenide funktsionaalsuse kohta ja kolme papilloomiviiruse subtüübi aminohappelise järjestuste võrdlusele. Sellise lähenemisega on võimalik tõlgendada E2 aktivatsioonidomeeni erinevaid aminohapete funktsioone ning näha, millised on vajalikud just replikatsiooniks, millised transkriptsiooniks ning kas on jääke, mis võiksid olla tähtsad mõlema etapi jaoks.

15 konstrueeritud E2 valgusmutanti testiti võimekuse järgi toetada E1 ja E2 ekspressioonivektoritel põhinevat transientset viiruse *origini*- replikatsiooni, mõjutada transkriptsiooni regulatsiooni ning samuti ka HPV-18 genoomi transientset replikatsiooni.

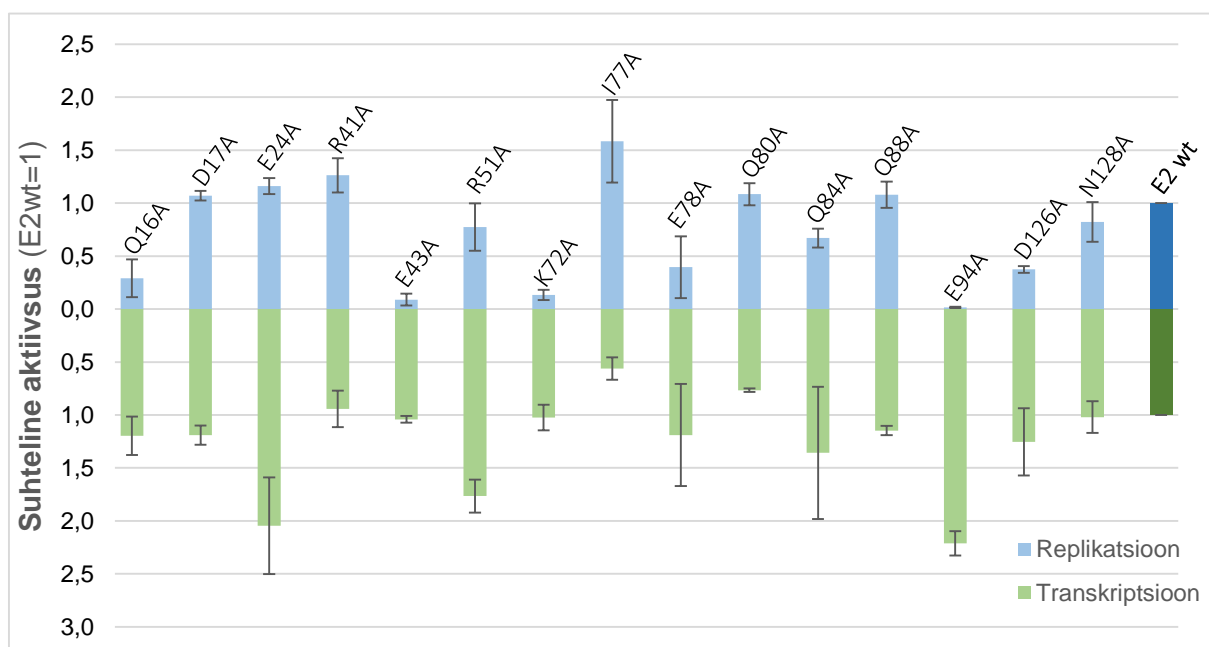
Meie töögrupp on viimastel aastatel publitseerinud mitmeid töid, mis on näidanud inimese osteosarkoomi rakuliini U2OS võimekust toetada efektiivselt papilloomiviiruse replikatsiooni ning jäljendada viiruse kõiki kolme replikatsioonifaasi viiruse genoomi kontekstis (Geimanen, Isok-Paas et al. 2011). Lisaks on kirjeldatud nii HPV-18, HPV-11, kui ka beeta-papilloomiviiruste alla kuuluva HPV-5 genoomide transkriptsioonikaarte U2OS rakkudes, mis on vastavuses andmetega, mis on eelnevalt kirjeldatud primaarsetes keratinotsüütides (Sankovski, Mannik et al. 2014, Toots, Mannik et al. 2014, Isok-Paas, Mannik et al. 2015). Antud tööde valguses on selge, et U2OS rakuliin on sobilik uurimaks viiruse elutsükli erinevaid tahke ning võimalus uurida kõiki põhilisi funktsioone ühes rakuliinis annab olulist lisaväärtust. Varasemad tööd BPV-1 ja HPV-16-ga eeldasid mitmete erinevate rakuliinide kasutamist, muutes seega ka erinevate tulemuste omavahelise võrdlemise keeruliseks.

E2 on oluline komponent HPV replikatsiooni käivitamisel. E2 vastutab selle eest, et E1 helikaas toimetataks viiruse replikatsiooni origini'ile. Lisaks võib E2 olla partneriks teistele rakulistele faktoritele, mis on vajalikud viiruse replikatsiooni initsiatsiooniks. E2 mutantide võimet mõjutada DNA replikatsiooni analüüsi transientses replikatsioonikatses koos URR sisaldavad plasmidi ja E1 valgu ekspressioonivektoriga. Leiti, et kõik mutandid peale E43A ja E94A suutsid alata replikatsiooni (Joonis 11 ja 15). HPV-16-nel E39A mutatsioon, mis on HPV-18 E43A vaste, ei olnud samuti võimeline replitseeruma ja ta ei moodustanud kompleksi E1 valguga (Sakai, Yasugi et al. 1996, Yasugi, Benson et al. 1997). Samas BPV-1-l omas E39A asendus väga väikest mõju valgu aktiivsusele (Abroi, Kurg et al. 1996). Seega võib järeldada, et E43A (E39A) asendus HPV kõrgeriski tüüpidel omab replikatsiooniaktiivsust hävitavat mõju, kuna E1:E2 interaktsioon ei saa toimuda. Täiesti erinevaid fenotüüpe põhjustas aga E94A asendus. Kui HPV-18-nel nähti E94A asenduses replikatsiooni inhibeerivat mõju, siis vastav E90A asendus BPV-1 oli replikatsiooni võimendav ning HPV-16-nel ei muutnud asendus valgu aktiivsust üldse. Erinevad mõjud olid ka K72A asendusel, mis HPV-18-nel pigem surus replikatsiooni maha, kuid BPV-1 ja HPV-16-nel (68A) ei muutnud valgu aktiivsust. Need erinevused replikatsiooni võimendavate/inhibeerivate asenduste osas võivad viidata, et replikatsiooni aktivatsioonis osalevad E2 valgu struktuursed osad erinevad viiruse tüübist sõltuvalt.

Lisaks E2 ekspresseerimisele ekspressioonivektoritelt ja järgneva replikatsioonifunktsiooni uurimist lühiajalises transientses replikatsioonikatses U2OS rakkudes, uuriti ka E2 mutantide võimet toetada replikatsiooni funktsiooni, kus nende E2 wt ja mutantide ekspressioon saavutati terves HPV-18 genoomi kontekstis (Joonis 14). Kahe replikatsioonianalüüsi andmed toetasid samu tulemusi, kus replikatsiooniline aktiivsus puudus mutantidel E43A, K72A ja E94A. Praegustest tulemustest võib järeldada, et lisaks mutatsioonile E43A, on HPV-18-nel replikatsiooniks olulised aminohappejäägid ka K72 ja E94. Seega saab eeldada, et antud aminohappejäägid on olulised seondumiskohad replikatsiooni initsiatsioonil, kus E2 valk seondub koöperatiivselt E1 helikaasiga. Nende aminohapete elimineerimisel ei pruugi E2 valk aidata enam mitte-spetsiifilisel E1 valgul tunda ära replikatsiooni origini ning replikatsioon ei ole efektiivne.

Antud katsetes oleme jälginud viiruse lühiajalist ehk transientset replikatsiooni. Kirjanduses on näidatud, et vajalikud faktorid transientses ja stabiilses replikatsioonis võivad olla erinevad (Thomas, Hubert et al. 1999, Baxter, McPhillips et al. 2005, Ilves, Maemets et al. 2006). Antud uurimustöö puhul võib genoomi replikatsiooni esialgsetest tulemustest näha, et mitmed mutandid ei pruugi olla suutelised jääma püsima stabiilses replikatsioonis

(replikatsioonisignaali vähenemine 96h ajapunktis). Asendused võivad mõjutada E2 rolli viiruse genoomi segregeerumisel tütrrakkude vahel nii, et viirus pole võimeline oma genoomi jagama ja replikatsioon hääbub. Lisaks võib olla võimalik, et stabiilse replikatsioonifaasis võivad olla vajalikud mõned teised rakulised faktorid. Stabiilse replikatsiooni uurimine nõuab lisakatseid, uurimaks täpselt, millised mutandid toetavad pikaajalist replikatsiooni. Samuti on vajalik mutantide viimine vastavatesse HPV-18 segregatsiooniplasmiididesse, mis võimaldavad uurida plasmidi jagunemise võimekust tütrrakkudesse. Praegu esitatud tulemused koos tulevikus jätkuvate katsetega peaksid andma uut informatsiooni, kuidas papilloomiviirused toimetavad nakatunud peremeesrakus ja andma enam võimalusi nende tegevusse vahelesegamiseks.



**Joonis 15. E2 mutantide replikatsioonilise ja transkriptsioonilise aktiivsuse võrdlus.**

Üleval pool x-telge on toodud replikatsiooniline aktiivsus ning allpool transkriptsiooniline mutantide aktiivsus võrrelduna E2 wt aktiivsuse suhtes.

Kui replikatsioonivõimet mõjutavad mutandid varieerusid sõltuvalt papilloomiviiruse tüübist, siis transkriptsiooni aktivatsioonil olid tulemused sarnased HPV-16 iseloomustatud asendustele (Joonis 15, replikatsiooni ja transkriptsiooni aktiivsuse võrdlus). I77A ja Q80A mutandid surusid transkriptsiooni maha ligi 2 korda rohkem kui E2 wt valk. Arvatavasti suudavad need mutandid moodustada efektiivsemalt repressorkompleksi. Eriti tugevaks repressoriks oli I77A ning tema mõju ulatub ka kolmele glutamiini jäägile kolmandas  $\alpha$ -heeliksis. Mida lähemal on glutamiini jääk I77A-le, seda vähem suudab mutant transkriptsiooni aktiveerida. Seega võiks

isoleutsiini jääk olla oluline interaktsioonide loomises ning lähemal olevad glutamiini jäägid on stabiliseeriva funktsiooniga. E24A, R51A ja E94A tunduvad seevastu olevat olulised aminohappe jäägid efektiivse repressorkompleksi moodustumiseks, kuna nende jääkide asendamiselalaniiniga vähenes mutantide transkriptsiooni repressioon ligi 1,5-2 korda võrreldes E2 wt-ga

Mutatsioon	Replikatsiooniline aktiivsus	URR reporteri transkriptsiooniaktiivsus <sup>b</sup>	Genoomi replikatsiooniaktiivsus <sup>c</sup>
Q16A	+	++	n/a
D17A	++	++	+
E24A	+++	+++	n/a
R41A	+++	++	+
E43A	–	++	–
R51A	++	+++	++
K72A	–	++	–
I77A	+++	+	++
E78A	+	++	++
Q80A	++	+	+
Q84A	++	+++	++
Q88A	++	++	+
E94A	–	+++	–
D126A	++	+++	+
N128A	++	++	+
E2 WT	++	++	++

**Tabel 2. E2 mutantsete valkude vahendatud transientse replikatsiooni, URR reporteri transkriptsioonilise aktiivsuse ja genoomi replikatsiooni võrdlus.**

a) Tulemused jooniselt 11. +++ 120% wt aktiivsusest; ++ 80 kuni 120% wt aktiivsusest; + 20 kuni 80% wt aktiivsusest; – <40% wt aktiivsusest.

b) Tulemused jooniselt 13. +++ 120% wt aktiivsusest; ++ 80 kuni 120% wt aktiivsusest; + 20 kuni 80% wt aktiivsusest; – <40% wt aktiivsusest.

c) Tulemused jooniselt 14. ++ 80 kuni 120% wt aktiivsusest; + 20 kuni 80% wt aktiivsusest; – <40% wt aktiivsusest; n/a – *not available*.

Antud töös esitatud tulemustest on näha, et N-terminaalne transaktivatsioonidomeen on vajalik tähtsatel viiruse eluetappidel. N-terminaalne domeen on aga tundlik aminohappeliste muutustele ja kindlate aminohappejääkide asendamine võimendab, vähendab või elimineerib üldse viiruse replikatsiooni- või transkriptsioonivõime (Tabel 2). Mutatsiooni, mis katkestaks korraga mõlemad protsessid, pole iseloomustatud. E43A ja E94 mutantid on säilitanud transkriptsioonilise regulatsioonivõime, kuid pole suutelised vahendama replikatsiooni koos E1 valguga. Vastupidiselt I77A mutant replitseerub nii genoomi kui ekspressioonivektoritega transientselt, kuid on väga tugev transkriptsiooniline repressor. Vähemalt nende mutantide põhjal saab väita, et transaktivatsiooni funktsiooni võimsus ei mõjuta replikatsiooni määra.

## KOKKUVÕTE

Inimese papilloomiviirused on väikesed kaheaheelalise genoomiga epiteelkoe rakke nakatavad DNA viirused. Viiruse elutsükkel on seotud vastavusse epiteelirakkude diferentseerumisprotsessiga ning vastavalt sellele saab HPV-de elutsükli jagada esialgseks transientseks replikatsiooniks, stabiilseks säilimiseks ja vegetatiivseks amplifikatsiooniks. Papilloomiviiruse üheks tähtsaks valguks on E2, mis osaleb kõigis olulistes etappides ning vahendab replikatsiooni, transkriptsiooni ja viiruse genoomide jaotumist.

Antud töö eesmärgiks oli uurida E2 valgu N-terminaalse transaktivatsioonidomeeni alaniini-asendusmutantide mõju E2 valgu aktiivsusele replikatsioonis ja transkriptsioonis. Töö kirjanduslik osa annab ülevaate papilloomiviiruste elutsüklist ning E2 valgu rollist.

Eksperimentaalses osas konstrueeriti 15 alaniini-asendusmutanti, mis kloonitati E2 ekspressioonivektorisse ja HPV-18 *minicircle* genoomi. Loodud mutante kasutati replikatsiooni ja transkriptsioonianalüüsides, et selgitada välja mutantide võime toetada nimetatud protsesse. Tulemuste põhjal leiti, et mutantidest polnud suutelised replitseerima E43A, K72A ja E94A. Vähenenud transkriptsioonilist aktiivsust täheldati eelkõige mutandil I77A, mis surus transkriptsiooni alla ligi 2 korda rohkem kui wt E2 valk. Leitud andmetest võib järeldada, et transkriptsiooni ja replikatsiooni eest vastutavad aminohapped E2 valgu sekundaarstruktuuris pole seotud ning neid võib eraldada. Teatud aminohappejääkide muteerumine toob kaasa E2 valgu suutmatuse interakteeruda oma replikatsioonipartneri E1-ga või transkriptsiooniliste faktoritega nagu TBP (*TATA-binding protein*), Sp1 ja TFIIB. Antud tulemusi edasi arendades võiksid need olla informatsiooniks HPV-18 E2 valgu erinevate aktiivsuste kirjeldamisel ning saamaks paremat ettekujutust E2 struktuurüksustest ja aminohapetest, mis on vajalikud transkriptsiooni- ja replikatsiooniprotsessideks.

# **Characterization of Single Amino Acid Substitutions in the Human Papillomavirus 18 E2 Protein Critical for the Transactivation and Replication Functions**

**Liis Noodla**

## **SUMMARY**

Human Papillomaviruses (HPVs) are small DNA viruses that infect epithelial keratinocytes. Some HPV types can induce cervical cancer and hence are classified as high-risk HPVs. Cervical carcinoma is the second most common cancer among women. The existing vaccines for high-risk types are only preventive and provide little benefit to women who have been already infected. Therefore it is important to understand the viral mechanisms to discover and develop new antiviral drugs.

The main regulator of the HPV life cycle is the viral E2 protein that is involved in the transcription regulation of viral genes, the replication of the viral genome and stable segregation of the viral genomes into the dividing cells. E2 protein has three different domains: N-terminal transactivation domain, variable internal hinge region and C-terminal DNA-binding domain. The N-terminal domain is crucial for the roles of E2 in transcription, replication and segregation and thus the N-terminal region is relatively conserved among the papillomavirus subtypes. Mutations on the N-terminal region can abrogate the E2 replicational and transcriptional functions.

In this research 15 different mutant HPV-18 E2 proteins with point mutations in the N-terminal transactivation domain are described. These mutations were designed using the alanine-scanning approach. The results obtained during this study showed that individual residues are capable of separating transcriptional regulation and replication functions. I77A change retained wild-type replication activity but was defective for the transactivation activity. E43A, K72A and E94A were deficient for DNA replication activity but retained the transcriptional regulation functions. As E2 role in replication is its ability to bind to viral E1 protein, in these three mutants this could be abolished. The E2 mutants described in this thesis could be useful in characterizing the different activities of E2 and identification of the specific structural components associated with various functions.

## KASUTATUD KIRJANDUS

- Abroi, A., I. Ilves, S. Kivi and M. Ustav (2004). "Analysis of chromatin attachment and partitioning functions of bovine papillomavirus type 1 E2 protein." J Virol **78**(4): 2100-2113.
- Abroi, A., R. Kurg and M. Ustav (1996). "Transcriptional and replicational activation functions in the bovine papillomavirus type 1 E2 protein are encoded by different structural determinants." J Virol **70**(9): 6169-6179.
- Arend, Ü., Kärner, J., Kübar, H., Pöldvere, K. 1994. Üldhistoloogia, lk 93-95. Valgus, Tallinn.
- Baker, T. S., W. W. Newcomb, N. H. Olson, L. M. Cowser, C. Olson and J. C. Brown (1991). "Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction." Biophys J **60**(6): 1445-1456.
- Bastien, N. and A. A. McBride (2000). "Interaction of the papillomavirus E2 protein with mitotic chromosomes." Virology **270**(1): 124-134.
- Baxter, M. K., M. G. McPhillips, K. Ozato and A. A. McBride (2005). "The mitotic chromosome binding activity of the papillomavirus E2 protein correlates with interaction with the cellular chromosomal protein, Brd4." J Virol **79**(8): 4806-4818.
- Bedrosian, C. L. and D. Bastian (1990). "The DNA-binding domain of HPV-16 E2 protein interaction with the viral enhancer: Protein-induced DNA bending and role of the nonconserved core sequence in binding site affinity." Virology **174**(2): 557-575.
- Benson, J. D., R. Lawande and P. M. Howley (1997). "Conserved interaction of the papillomavirus E2 transcriptional activator proteins with human and yeast TFIIB proteins." J Virol **71**(10): 8041-8047.
- Bernard, H. U., R. D. Burk, Z. Chen, K. van Doorslaer, H. zur Hausen and E. M. de Villiers (2010). "Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments." Virology **401**(1): 70-79.
- Bonne-Andrea, C., S. Santucci and P. Clertant (1995). "Bovine papillomavirus E1 protein can, by itself, efficiently drive multiple rounds of DNA synthesis in vitro." J Virol **69**(5): 3201-3205.
- Breiding, D. E., F. Sverdrup, M. J. Grossel, N. Moscufo, W. Boonchai and E. J. Androphy (1997). "Functional interaction of a novel cellular protein with the papillomavirus E2 transactivation domain." Mol Cell Biol **17**(12): 7208-7219.

- Chabot, S., J. Orio, M. Schmeer, M. Schleef, M. Golzio and J. Teissie (2013). "Minicircle DNA electrotransfer for efficient tissue-targeted gene delivery." Gene Ther **20**(1): 62-68.
- Conway, M. J. and C. Meyers (2009). "Replication and assembly of human papillomaviruses." J Dent Res **88**(4): 307-317.
- Corden, S. A., L. J. Sant-Cassia, A. J. Easton and A. G. Morris (1999). "The integration of HPV-18 DNA in cervical carcinoma." Journal of Clinical Pathology-Molecular Pathology **52**(5): 275-282.
- Cunningham, B. C. and J. A. Wells (1989). "High-resolution epitope mapping of hGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis." Science **244**(4908): 1081-1085.
- Day, P. M., D. R. Lowy and J. T. Schiller (2003). "Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway." Virology **307**(1): 1-11.
- de Villiers, E. M., C. Fauquet, T. R. Broker, H. U. Bernard and H. zur Hausen (2004). "Classification of papillomaviruses." Virology **324**(1): 17-27.
- DiMaio, D. and D. Mattoon (2001). "Mechanisms of cell transformation by papillomavirus E5 proteins." Oncogene **20**(54): 7866-7873.
- Doorbar, J. (2005). "The papillomavirus life cycle." J Clin Virol **32 Suppl 1**: S7-15.
- Doorbar, J. (2006). "Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer." Clin Sci (Lond) **110**(5): 525-541.
- Doorbar, J. (2006). "Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer." Clinical Science **110**(5): 525-541.
- Doorbar, J., S. Ely, J. Sterling, C. McLean and L. Crawford (1991). "Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network." Nature **352**(6338): 824-827.
- Dostatni, N., F. Thierry and M. Yaniv (1988). "A dimer of BPV-1 E2 containing a protease resistant core interacts with its DNA target." EMBO J **7**(12): 3807-3816.
- Dyson, N. (1998). "The regulation of E2F by pRB-family proteins." Genes Dev **12**(15): 2245-2262.
- Ferguson, M. K. and M. R. Botchan (1996). "Genetic analysis of the activation domain of bovine papillomavirus protein E2: its role in transcription and replication." J Virol **70**(7): 4193-4199.



- Florin, L., C. Sapp, R. E. Streeck and M. Sapp (2002). "Assembly and translocation of papillomavirus capsid proteins." J Virol **76**(19): 10009-10014.
- Fradet-Turcotte, A., F. Bergeron-Labrecque, C. A. Moody, M. Lehoux, L. A. Laimins and J. Archambault (2011). "Nuclear accumulation of the papillomavirus E1 helicase blocks S-phase progression and triggers an ATM-dependent DNA damage response." J Virol **85**(17): 8996-9012.
- Geimanen, J., H. Isok-Paas, R. Pipitch, K. Salk, T. Laos, M. Orav, T. Reinson, M. Ustav, Jr., M. Ustav and E. Ustav (2011). "Development of a cellular assay system to study the genome replication of high- and low-risk mucosal and cutaneous human papillomaviruses." J Virol **85**(7): 3315-3329.
- Giri, I. and M. Yaniv (1988). "Structural and mutational analysis of E2 trans-activating proteins of papillomaviruses reveals three distinct functional domains." EMBO J **7**(9): 2823-2829.
- Han, Y., Y. M. Loo, K. T. Militello and T. Melendy (1999). "Interactions of the papovavirus DNA replication initiator proteins, bovine papillomavirus type 1 E1 and simian virus 40 large T antigen, with human replication protein A." J Virol **73**(6): 4899-4907.
- Harris, S. F. and M. R. Botchan (1999). "Crystal structure of the human papillomavirus type 18 E2 activation domain." Science **284**(5420): 1673-1677.
- Harwood, C. A., T. Suretheran, P. Sasieni, C. M. Proby, C. Bordea, I. M. Leigh, F. Wojnarowska, J. Breuer and J. M. McGregor (2004). "Increased risk of skin cancer associated with the presence of epidermodysplasia verruciformis human papillomavirus types in normal skin." Br J Dermatol **150**(5): 949-957.
- Hawley-Nelson, P., E. J. Androphy, D. R. Lowy and J. T. Schiller (1988). "The specific DNA recognition sequence of the bovine papillomavirus E2 protein is an E2-dependent enhancer." EMBO J **7**(2): 525-531.
- Hegde, R. S. (2002). "The papillomavirus E2 proteins: structure, function, and biology." Annu Rev Biophys Biomol Struct **31**: 343-360.
- Hines, C. S., C. Meghoo, S. Shetty, M. Biburger, M. Brenowitz and R. S. Hegde (1998). "DNA structure and flexibility in the sequence-specific binding of papillomavirus E2 proteins1." Journal of Molecular Biology **276**(4): 809-818.
- Hoffmann, R., B. Hirt, V. Bechtold, P. Beard and K. Raj (2006). "Different modes of human papillomavirus DNA replication during maintenance." J Virol **80**(9): 4431-4439.

- Hummel, M., J. B. Hudson and L. A. Laimins (1992). "Differentiation-induced and constitutive transcription of human papillomavirus type 31b in cell lines containing viral episomes." J Virol **66**(10): 6070-6080.
- Ilves, I., K. Maemets, T. Silla, K. Janikson and M. Ustav (2006). "Brd4 is involved in multiple processes of the bovine papillomavirus type 1 life cycle." J Virol **80**(7): 3660-3665.
- Isok-Paas, H., A. Mannik, E. Ustav and M. Ustav (2015). "The transcription map of HPV11 in U2OS cells adequately reflects the initial and stable replication phases of the viral genome." Virol J **12**(1): 59.
- Jang, M. K., D. Kwon and A. A. McBride (2009). "Papillomavirus E2 proteins and the host BRD4 protein associate with transcriptionally active cellular chromatin." J Virol **83**(6): 2592-2600.
- Johansson, C. and S. Schwartz (2013). "Regulation of human papillomavirus gene expression by splicing and polyadenylation." Nat Rev Microbiol **11**(4): 239-251.
- Kay, M. A., C. Y. He and Z. Y. Chen (2010). "A robust system for production of minicircle DNA vectors." Nat Biotechnol **28**(12): 1287-1289.
- Kirnbauer, R., F. Booy, N. Cheng, D. R. Lowy and J. T. Schiller (1992). "Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(24): 12180-12184.
- Klingelhutz, A. J., S. A. Foster and J. K. McDougall (1996). "Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16." Nature **380**(6569): 79-82.
- Kurg, R., P. Uusen, L. Vosa and M. Ustav (2010). "Human papillomavirus E2 protein with single activation domain initiates HPV18 genome replication, but is not sufficient for long-term maintenance of virus genome." Virology **408**(2): 159-166.
- Kurg, R. (2011). "The role of E2 protein in Papillomavirus DNA replication". DNA Replication, (edited by Seligmann, H.), pp.613-638.
- Lazarczyk, M., P. Cassonnet, C. Pons, Y. Jacob and M. Favre (2009). "The EVER proteins as a natural barrier against papillomaviruses: a new insight into the pathogenesis of human papillomavirus infections." Microbiol Mol Biol Rev **73**(2): 348-370.
- Lee, D., S. G. Hwang, J. Kim and J. Choe (2002). "Functional interaction between p/CAF and human papillomavirus E2 protein." J Biol Chem **277**(8): 6483-6489.

- Lee, D., B. Lee, J. Kim, D. W. Kim and J. Choe (2000). "cAMP response element-binding protein-binding protein binds to human papillomavirus E2 protein and activates E2-dependent transcription." J Biol Chem **275**(10): 7045-7051.
- Li, R., J. Knight, G. Bream, A. Stenlund and M. Botchan (1989). "Specific recognition nucleotides and their DNA context determine the affinity of E2 protein for 17 binding sites in the BPV-1 genome." Genes Dev **3**(4): 510-526.
- Li, R., J. D. Knight, S. P. Jackson, R. Tjian and M. R. Botchan (1991). "Direct interaction between Sp1 and the BPV enhancer E2 protein mediates synergistic activation of transcription." Cell **65**(3): 493-505.
- Liu, J. S., S. R. Kuo, T. R. Broker and L. T. Chow (1995). "The functions of human papillomavirus type 11 E1, E2, and E2C proteins in cell-free DNA replication." J Biol Chem **270**(45): 27283-27291.
- Markowitz, L. E., V. Tsu, S. L. Deeks, H. Cubie, S. A. Wang, A. S. Vicari and J. M. Brotherton (2012). "Human papillomavirus vaccine introduction--the first five years." Vaccine **30 Suppl 5**: F139-148.
- Masterson, P. J., M. A. Stanley, A. P. Lewis and M. A. Romanos (1998). "A C-terminal helicase domain of the human papillomavirus E1 protein binds E2 and the DNA polymerase alpha-primase p68 subunit." J Virol **72**(9): 7407-7419.
- McBride, A. A., H. Romanczuk and P. M. Howley (1991). "The papillomavirus E2 regulatory proteins." J Biol Chem **266**(28): 18411-18414.
- McKee, S. J., A. S. Bergot and G. R. Leggatt (2015). "Recent progress in vaccination against human papillomavirus-mediated cervical cancer." Rev Med Virol **25 Suppl 1**: 54-71.
- McPhillips, M. G., J. G. Oliveira, J. E. Spindler, R. Mitra and A. A. McBride (2006). "Brd4 is required for e2-mediated transcriptional activation but not genome partitioning of all papillomaviruses." J Virol **80**(19): 9530-9543.
- Mohr, I. J., R. Clark, S. Sun, E. J. Androphy, P. MacPherson and M. R. Botchan (1990). "Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator." Science **250**(4988): 1694-1699.
- Morin, G., A. Fradet-Turcotte, P. Di Lello, F. Bergeron-Labrecque, J. G. Omichinski and J. Archambault (2011). "A conserved amphipathic helix in the N-terminal regulatory region of the papillomavirus E1 helicase is required for efficient viral DNA replication." J Virol **85**(11): 5287-5300.

- Muller, A., A. Ritzkowski and G. Steger (2002). "Cooperative activation of human papillomavirus type 8 gene expression by the E2 protein and the cellular coactivator p300." J Virol **76**(21): 11042-11053.
- Munger, K., A. Baldwin, K. M. Edwards, H. Hayakawa, C. L. Nguyen, M. Owens, M. Grace and K. Huh (2004). "Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis." J Virol **78**(21): 11451-11460.
- Munger, K., M. Scheffner, J. M. Huibregtse and P. M. Howley (1992). "Interactions of HPV E6 and E7 oncoproteins with tumour suppressor gene products." Cancer Surv **12**: 197-217.
- Munger, K., B. A. Werness, N. Dyson, W. C. Phelps, E. Harlow and P. M. Howley (1989). "Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product." EMBO J **8**(13): 4099-4105.
- Nakahara, T., A. Nishimura, M. Tanaka, T. Ueno, A. Ishimoto and H. Sakai (2002). "Modulation of the cell division cycle by human papillomavirus type 18 E4." J Virol **76**(21): 10914-10920.
- Oelze, I., J. Kartenbeck, K. Crusius and A. Alonso (1995). "Human papillomavirus type 16 E5 protein affects cell-cell communication in an epithelial cell line." J Virol **69**(7): 4489-4494.
- Oliveira, J. G., L. A. Colf and A. A. McBride (2006). "Variations in the association of papillomavirus E2 proteins with mitotic chromosomes." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(4): 1047-1052.
- Ozbun, M. A. and C. Meyers (1998). "Temporal usage of multiple promoters during the life cycle of human papillomavirus type 31b." J Virol **72**(4): 2715-2722.
- Parish, J. L., A. M. Bean, R. B. Park and E. J. Androphy (2006). "ChlR1 is required for loading papillomavirus E2 onto mitotic chromosomes and viral genome maintenance." Mol Cell **24**(6): 867-876.
- Piirsoo, M., E. Ustav, T. Mandel, A. Stenlund and M. Ustav (1996). "Cis and trans requirements for stable episomal maintenance of the BPV-1 replicator." EMBO J **15**(1): 1-11.
- Poddar, A., S. C. Reed, M. G. McPhillips, J. E. Spindler and A. A. McBride (2009). "The human papillomavirus type 8 E2 tethering protein targets the ribosomal DNA loci of host mitotic chromosomes." J Virol **83**(2): 640-650.

- Raj, K., S. Berguerand, S. Southern, J. Doorbar and P. Beard (2004). "E1 empty set E4 protein of human papillomavirus type 16 associates with mitochondria." J Virol **78**(13): 7199-7207.
- Reinson, T., M. Toots, M. Kadaja, R. Pipitch, M. Allik, E. Ustav and M. Ustav (2013). "Engagement of the ATR-dependent DNA damage response at the human papillomavirus 18 replication centers during the initial amplification." J Virol **87**(2): 951-964.
- Romanczuk, H., F. Thierry and P. M. Howley (1990). "Mutational analysis of cis elements involved in E2 modulation of human papillomavirus type 16 P97 and type 18 P105 promoters." J Virol **64**(6): 2849-2859.
- Rose, R. C., R. C. Reichman and W. Bonneze (1994). "Human papillomavirus (HPV) type 11 recombinant virus-like particles induce the formation of neutralizing antibodies and detect HPV-specific antibodies in human sera." J Gen Virol **75** ( Pt 8): 2075-2079.
- Sakai, H., T. Yasugi, J. D. Benson, J. J. Dowhanick and P. M. Howley (1996). "Targeted mutagenesis of the human papillomavirus type 16 E2 transactivation domain reveals separable transcriptional activation and DNA replication functions." J Virol **70**(3): 1602-1611.
- Sakakibara, N., R. Mitra and A. A. McBride (2011). "The papillomavirus E1 helicase activates a cellular DNA damage response in viral replication foci." J Virol **85**(17): 8981-8995.
- Sanders, C. M. and A. Stenlund (1998). "Recruitment and loading of the E1 initiator protein: an ATP-dependent process catalysed by a transcription factor." EMBO J **17**(23): 7044-7055.
- Sankovski, E., A. Mannik, J. Geimanen, E. Ustav and M. Ustav (2014). "Mapping of betapapillomavirus human papillomavirus 5 transcription and characterization of viral-genome replication function." J Virol **88**(2): 961-973.
- Scheffner, M., B. A. Werness, J. M. Huibregtse, A. J. Levine and P. M. Howley (1990). "The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53." Cell **63**(6): 1129-1136.
- Schiller, J. T., X. Castellsague, L. L. Villa and A. Hildesheim (2008). "An update of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like particle vaccine clinical trial results." Vaccine **26 Suppl 10**: K53-61.

- Schweiger, M. R., M. Ottinger, J. You and P. M. Howley (2007). "Brd4-independent transcriptional repression function of the papillomavirus e2 proteins." J Virol **81**(18): 9612-9622.
- Sedman, J. and A. Stenlund (1995). "Co-operative interaction between the initiator E1 and the transcriptional activator E2 is required for replicator specific DNA replication of bovine papillomavirus in vivo and in vitro." EMBO J **14**(24): 6218-6228.
- Sedman, J. and A. Stenlund (1998). "The papillomavirus E1 protein forms a DNA-dependent hexameric complex with ATPase and DNA helicase activities." J Virol **72**(8): 6893-6897.
- Shafti-Keramat, S., A. Handisurya, E. Kriehuber, G. Meneguzzi, K. Slupetzky and R. Kirnbauer (2003). "Different heparan sulfate proteoglycans serve as cellular receptors for human papillomaviruses." J Virol **77**(24): 13125-13135.
- Skiadopoulos, M. H. and A. A. McBride (1998). "Bovine papillomavirus type 1 genomes and the E2 transactivator protein are closely associated with mitotic chromatin." J Virol **72**(3): 2079-2088.
- Soeda, E., M. C. Ferran, C. C. Baker and A. A. McBride (2006). "Repression of HPV16 early region transcription by the E2 protein." Virology **351**(1): 29-41.
- Spalholz, B. A., Y. C. Yang and P. M. Howley (1985). "Transactivation of a bovine papilloma virus transcriptional regulatory element by the E2 gene product." Cell **42**(1): 183-191.
- Spink, K. M. and L. A. Laimins (2005). "Induction of the human papillomavirus type 31 late promoter requires differentiation but not DNA amplification." J Virol **79**(8): 4918-4926.
- Stauffer, Y., K. Raj, K. Masternak and P. Beard (1998). "Infectious human papillomavirus type 18 pseudovirions." J Mol Biol **283**(3): 529-536.
- Steenbergen, R. D., J. de Wilde, S. M. Wilting, A. A. Brink, P. J. Snijders and C. J. Meijer (2005). "HPV-mediated transformation of the anogenital tract." J Clin Virol **32 Suppl 1**: S25-33.
- Steger, G. and S. Corbach (1997). "Dose-dependent regulation of the early promoter of human papillomavirus type 18 by the viral E2 protein." J Virol **71**(1): 50-58.
- Steger, G., J. Ham, O. Lefebvre and M. Yaniv (1995). "The bovine papillomavirus 1 E2 protein contains two activation domains: one that interacts with TBP and another that functions after TBP binding." EMBO J **14**(2): 329-340.

- Stoler, M. H., C. R. Rhodes, A. Whitbeck, S. M. Wolinsky, L. T. Chow and T. R. Broker (1992). "Human papillomavirus type 16 and 18 gene expression in cervical neoplasias." Hum Pathol **23**(2): 117-128.
- Stoppler, M. C., S. W. Straight, G. Tsao, R. Schlegel and D. J. McCance (1996). "The E5 gene of HPV-16 enhances keratinocyte immortalization by full-length DNA." Virology **223**(1): 251-254.
- Straight, S. W., P. M. Hinkle, R. J. Jewers and D. J. McCance (1993). "The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 transforms fibroblasts and effects the downregulation of the epidermal growth factor receptor in keratinocytes." J Virol **67**(8): 4521-4532.
- Stubenrauch, F., M. Hummel, T. Iftner and L. A. Laimins (2000). "The E8E2C protein, a negative regulator of viral transcription and replication, is required for extrachromosomal maintenance of human papillomavirus type 31 in keratinocytes." J Virol **74**(3): 1178-1186.
- Stubenrauch, F. and L. A. Laimins (1999). "Human papillomavirus life cycle: active and latent phases." Semin Cancer Biol **9**(6): 379-386.
- Stubenrauch, F., H. B. Lim and L. A. Laimins (1998). "Differential requirements for conserved E2 binding sites in the life cycle of oncogenic human papillomavirus type 31." J Virol **72**(2): 1071-1077.
- Sun, Y., H. Han and D. J. McCance (1998). "Active domains of human papillomavirus type 11 E1 protein for origin replication." J Gen Virol **79** ( Pt 7): 1651-1658.
- Zhang, B., P. Li, E. Wang, Z. Brahmi, K. W. Dunn, J. S. Blum and A. Roman (2003). "The E5 protein of human papillomavirus type 16 perturbs MHC class II antigen maturation in human foreskin keratinocytes treated with interferon-gamma." Virology **310**(1): 100-108.
- Zhang, B., D. F. Spandau and A. Roman (2002). "E5 protein of human papillomavirus type 16 protects human foreskin keratinocytes from UV B-irradiation-induced apoptosis." J Virol **76**(1): 220-231.
- Zheng, Z. M. and C. C. Baker (2006). "Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation." Front Biosci **11**: 2286-2302.
- Zhou, J., X. Y. Sun, D. J. Stenzel and I. H. Frazer (1991). "Expression of vaccinia recombinant HPV 16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles." Virology **185**(1): 251-257.

- Thomas, J. T., W. G. Hubert, M. N. Ruesch and L. A. Laimins (1999). "Human papillomavirus type 31 oncoproteins E6 and E7 are required for the maintenance of episomes during the viral life cycle in normal human keratinocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(15): 8449-8454.
- Titolo, S., K. Brault, J. Majewski, P. W. White and J. Archambault (2003). "Characterization of the minimal DNA binding domain of the human papillomavirus e1 helicase: fluorescence anisotropy studies and characterization of a dimerization-defective mutant protein." J Virol **77**(9): 5178-5191.
- Toots, M., A. Mannik, G. Kivi, M. Ustav, Jr., E. Ustav and M. Ustav (2014). "The transcription map of human papillomavirus type 18 during genome replication in U2OS cells." PLoS One **9**(12): e116151.
- Ustav, M. and A. Stenlund (1991). "Transient replication of BPV-1 requires two viral polypeptides encoded by the E1 and E2 open reading frames." EMBO J **10**(2): 449-457.
- Ustav, M., E. Ustav, P. Szymanski and A. Stenlund (1991). "Identification of the origin of replication of bovine papillomavirus and characterization of the viral origin recognition factor E1." EMBO J **10**(13): 4321-4329.
- Walboomers, J. M., M. V. Jacobs, M. M. Manos, F. X. Bosch, J. A. Kummer, K. V. Shah, P. J. Snijders, J. Peto, C. J. Meijer and N. Munoz (1999). "Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide." J Pathol **189**(1): 12-19.
- Van Tine, B. A., L. D. Dao, S. Y. Wu, T. M. Sonbuchner, B. Y. Lin, N. Zou, C. M. Chiang, T. R. Broker and L. T. Chow (2004). "Human papillomavirus (HPV) origin-binding protein associates with mitotic spindles to enable viral DNA partitioning." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(12): 4030-4035.
- White, A. E., E. M. Livanos and T. D. Tlsty (1994). "Differential disruption of genomic integrity and cell cycle regulation in normal human fibroblasts by the HPV oncoproteins." Genes Dev **8**(6): 666-677.
- World Health Organization. "Human Papillomavirus (HPV) and cervical cancer". Fact sheet N 380, reviewed March 2015.
- Wu, S. Y., A. Y. Lee, S. Y. Hou, J. K. Kemper, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst and C. M. Chiang (2006). "Brd4 links chromatin targeting to HPV transcriptional silencing." Genes Dev **20**(17): 2383-2396.

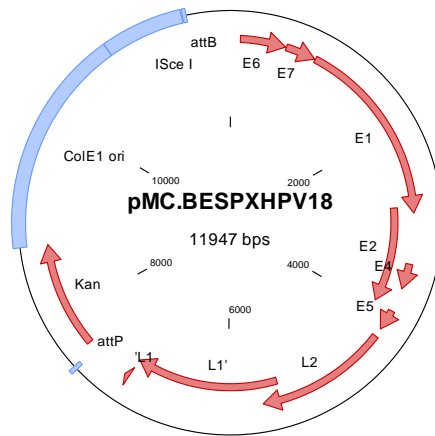


- Yang, R., P. M. Day, W. H. t. Yutzy, K. Y. Lin, C. F. Hung and R. B. Roden (2003). "Cell surface-binding motifs of L2 that facilitate papillomavirus infection." J Virol **77**(6): 3531-3541.
- Yasugi, T., J. D. Benson, H. Sakai, M. Vidal and P. M. Howley (1997). "Mapping and characterization of the interaction domains of human papillomavirus type 16 E1 and E2 proteins." J Virol **71**(2): 891-899.
- You, J., J. L. Croyle, A. Nishimura, K. Ozato and P. M. Howley (2004). "Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes." Cell **117**(3): 349-360.
- Yu, T., Y. C. Peng and E. J. Androphy (2007). "Mitotic kinesin-like protein 2 binds and colocalizes with papillomavirus E2 during mitosis." J Virol **81**(4): 1736-1745.

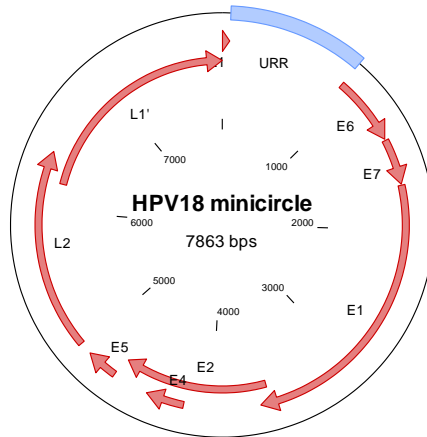
## LISAD

### Lisa 1 – Plasmiidid

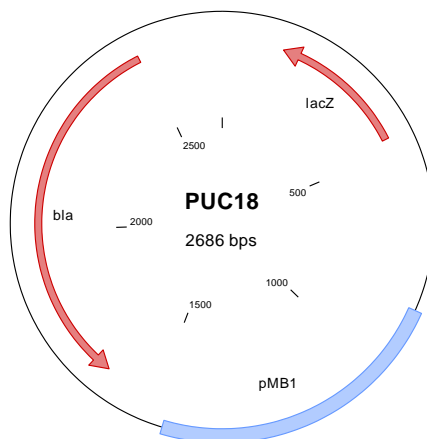
#### A) pMC.BESPX-HPV-18



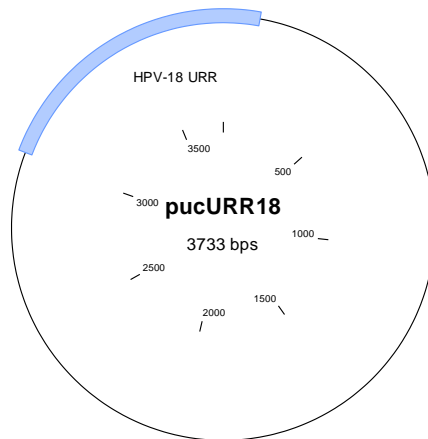
#### B) HPV-18 minicircle



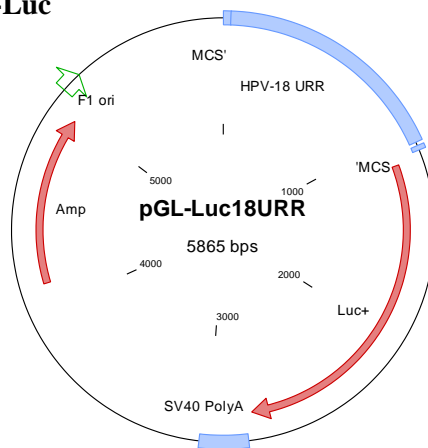
#### C) pUC18



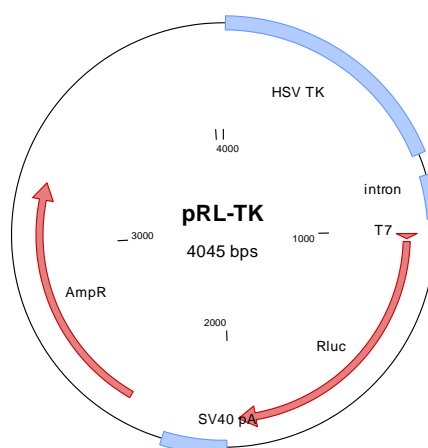
#### D) pUC-18URR



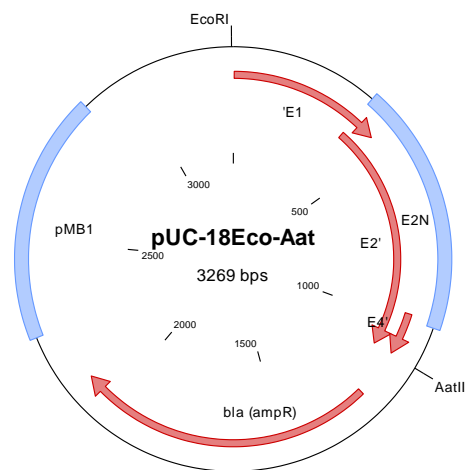
#### E) pGL18URR-Luc



#### F) pRL-Tk

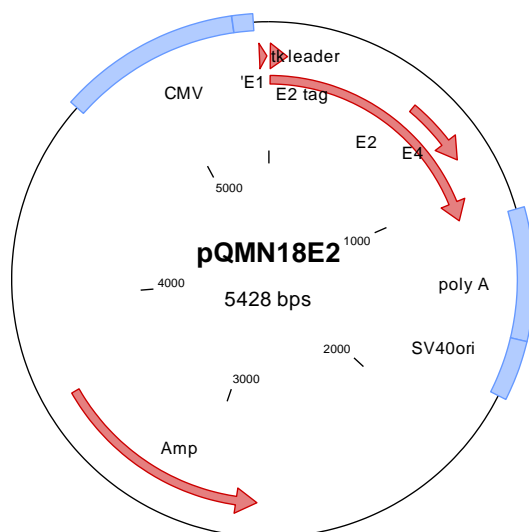


### G) pUC-18-EcoRI-AatII

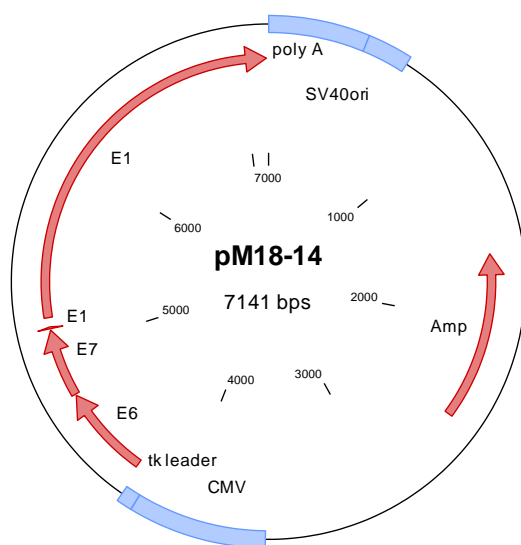


## Lisa 2 – Ekspressioonivektorid

### A) pQMN18E2



### B) pM18-14



## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Liis Noodla (05.09.1990)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose  
**„Inimese papilloomiviiruse tüüp 18 E2 valgu aminohappeliste asendusmutantide  
iseloomustamine viiruse transkriptsiooni ja replikatsiooni funktsioonides“,**

mille juhendaja on Mart Ustav, MSc,

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **26.05.2017** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26.05.2015. (*kuupäev*)